

WO 7900910

NOV 1979

DIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets: C07H 3/08, 3/06, 15/18; A61K 31/70; G01N 33/16	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 79/00910 (43) Date de publication internationale: 15 novembre 1979 (15.11.79)
(21) Numéro de la demande internationale:PCT/FR79/00031		(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal, etc.; Cabinet Plas-seraud, 84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris (FR).
(22) Date de dépôt international: 10 avril 1979 (10.04.79)		
(31) Numéro de la demande prioritaire: 78/10558		(81) Etats désignés: DK, JP, US.
(32) Date de priorité: 10 avril 1978 (10.04.78)		Publiée avec: <i>Rapport de recherche internationale</i>
(33) Pays de priorité: FR		Publiée avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): AGEN-CENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RE-CHERCHE (ANVAR) [FR/FR]; 13, rue Madeleine Michelis, 92522 Neuilly sur Seine (FR).		
(72) Inventeurs; et		
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): SINAY, Pierre [FR/FR]; 5, rue Jacques Monod, 45100 Orléans (FR). JACQUINET, Jean-Claude [FR/FR]; 1, allée André Gide, 45100 Orléans la Source (FR). POUGNY, Jean-René [FR/FR]; 30, rue du Général de Gaulle, 18700 Aubigny-sur-mere (FR).		

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING DERIVATIVES OF OSIDES, NEW OSIDE DERIVATIVES OBTAINED AND BIOLOGICAL APPLICATION THEREOF

(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE DERIVES D'OSIDES, LES NOUVEAUX DERIVES D'OSIDES OBTENUS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

## (57) Abstract

New process for preparing osides. This process involves the reaction of an ose substituted in position 1 by a -O-imidyl group with an ose containing only a free OH group. Application: preparation of the trisaccharide B.

## (57) Abrégé

Nouveau procédé de préparation d'osides. Ce procédé comprend la réaction d'un ose substitué en position 1 par un groupe -O-imidyle avec un ose ne renfermant qu'un groupe OH libre. Application: préparation du trisaccharide B.

biologiques, en particulier en immunohématologie et plus spécialement dans la détermination des groupes sanguins.

Mais ces diverses applications ne peuvent être mises en oeuvre à grande échelle que si l'on peut disposer aisément et avec des rendements élevés du trisaccharide B ou de dérivés osidiques possédant sa structure.

Outre le problème de la synthèse de ces produits, se pose celui de la forme sous laquelle ils sont obtenus. On remarquera à cet égard que, selon le type d'application envisagé, le dérivé d'oside à spécificité antigénique pourra être utilisé tel quel, par exemple comme réactif antigénique ou pour élaborer un sérum-test ou devra comporter une chaîne de substitution, plus particulièrement un bras de couplage afin d'être fixé sur un support, et ce, pour constituer plus spécialement un antigène artificiel ou un immunoabsorbant.

Le problème est donc de disposer d'un dérivé osidique à partir duquel les diverses applications souhaitées pourront être aisément mises en oeuvre.

Or, les méthodes proposées à ce jour pour la synthèse de dérivés osidiques constituant les déterminants antigéniques de groupe sanguin et les rendements auxquels elles conduisent ne s'avèrent pas entièrement satisfaisants.

De plus, les produits obtenus ne peuvent être facilement modifiés en vue de leur utilisation dans une application donnée.

L'étude de ces problèmes par les inventeurs les a conduits à l'élaboration d'une nouvelle voie de synthèse stéréospécifique permettant d'obtenir aisément, avec une excellente pureté et des rendements élevés, des dérivés d'osides ouvrant la voie à de nombreuses applications biologiques. D'une manière particulièrement avantageuse, cette voie de synthèse permet d'obtenir des osides branchés, c'est-à-dire à chaînes osidiques latérales, tel que le trisaccharide B.

L'intérêt de cette nouvelle voie de synthèse est d'autant plus précieux qu'elle conduit à l'obtention de nouveaux dérivés d'osides, en particulier de l'i-

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	LU	Luxembourg
BR	Brésil	MC	Monaco
CF	Empire centrafricain	MG	Madagascar
CG	Congo	MW	Malawi
CH	Suisse	NL	Pays-Bas
CM	Cameroun	RO	Roumanie
DE	Allemagne, République fédérale d'	SE	Suède
DK	Danemark	SN	Sénégal
FR	France	SU	Union soviétique
GA	Gabon	TD	Tchad
GB	Royaume-Uni	TG	Togo
JP	Japon	US	Etats-Unis d'Amérique

1

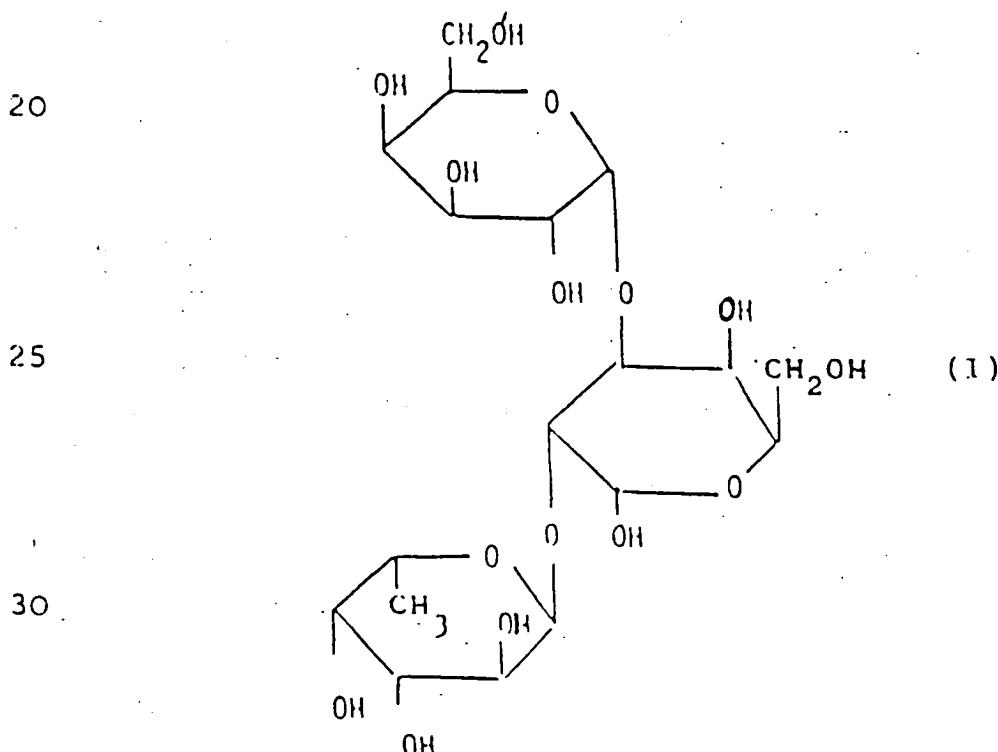
Procédé de préparation de dérivés d'osides,  
les nouveaux dérivés d'osides obtenus et leurs  
applications biologiques

L'invention a pour objet un nouveau procédé de pré-  
5 paration de dérivés d'osides, les nouveaux dérivés d'osides  
obtenus et leurs applications biologiques.

L'étude des dérivés d'osides, c'est-à-dire de dérivés comportant plusieurs motifs oses ou monosaccharides, suscite un grand intérêt : un certain nombre d'entre eux se 10 sont, en effet, révélés biologiquement et chimiquement actifs ou capables de conduire à de telles substances actives.

Entre autres, il s'est avéré que certains tri- et tétrasaccharides possèdent une spécificité de groupe san-  
15 guin.

Ainsi, le trisaccharide 2-O-( $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-D-galactopyranose de formule I :



35 constitue le déterminant antigénique B de groupe sanguin humain. En raison de cette spécificité antigénique, ce trisaccharide (appelé ci-après trisaccharide B) trouve des applications de grande importance dans divers secteurs

biologiques, en particulier en immunohématologie et plus spécialement dans la détermination des groupes sanguins.

Mais ces diverses applications ne peuvent être mises en oeuvre à grande échelle que si l'on peut disposer aisément et avec des rendements élevés du trisaccharide B ou de dérivés osidiques possédant sa structure.

Outre le problème de la synthèse de ces produits, se pose celui de la forme sous laquelle ils sont obtenus. On remarquera à cet égard que, selon le type d'application envisagé, le dérivé d'oside à spécificité antigénique pourra être utilisé tel quel, par exemple comme réactif antigénique ou pour élaborer un sérum-test ou devra comporter une chaîne de substitution, plus particulièrement un bras de couplage afin d'être fixé sur un support, et ce, pour constituer plus spécialement un antigène artificiel ou un immunoabsorbant.

Le problème est donc de disposer d'un dérivé osidique à partir duquel les diverses applications souhaitées pourront être aisément mises en oeuvre.

Or, les méthodes proposées à ce jour pour la synthèse de dérivés osidiques constituant les déterminants antigéniques de groupe sanguin et les rendements auxquels elles conduisent ne s'avèrent pas entièrement satisfaisants.

De plus, les produits obtenus ne peuvent être facilement modifiés en vue de leur utilisation dans une application donnée.

L'étude de ces problèmes par les inventeurs les a conduits à l'élaboration d'une nouvelle voie de synthèse stéréospécifique permettant d'obtenir aisément, avec une excellente pureté et des rendements élevés, des dérivés d'osides ouvrant la voie à de nombreuses applications biologiques. D'une manière particulièrement avantageuse, cette voie de synthèse permet d'obtenir des osides branchés, c'est-à-dire à chaînes osidiques latérales, tel que le trisaccharide B.

L'intérêt de cette nouvelle voie de synthèse est d'autant plus précieux qu'elle conduit à l'obtention de nouveaux dérivés d'osides, en particulier de dérivés d'

substitution du trisaccharide B utilisables notamment dans les applications biologiques évoquées plus haut.

D'une manière avantageuse, il s'avère que ces nouveaux dérivés, grâce à leurs caractéristiques chimiques propres, facilitent la mise en oeuvre de ces applications, en particulier peuvent être aisément modifiés selon l'application souhaitée ou même directement utilisables.

L'invention a donc pour but de fournir un nouveau procédé de synthèse de dérivés d'osides permettant de disposer aisément de grandes quantités d'osides et notamment d'osides branchés tels que le trisaccharide B ou des dérivés de substitution de ce dernier.

Selon un autre aspect, elle a pour but de fournir de nouveaux osides, en particulier de nouveaux dérivés de di- et trisaccharides, et plus spécialement des dérivés d'osides possédant la structure du trisaccharide B.

Selon encore un autre aspect, elle vise les applications biologiques des nouveaux dérivés d'osides.

Le procédé de synthèse de dérivés d'osides selon l'invention est caractérisé en ce qu'on fait réagir

- un dérivé d'oside a) constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché (s) à un reste organique, ce motif ose, ou l'un au moins de ces motifs oses, étant substitué, sur le carbone anomère en position 1, par un groupe -O- imidyle de formule  $-O-C(-R_2)=N-R_1$  dans laquelle les substituants  $R_1$  et  $R_2$ , identiques ou différents l'un de l'autre, représentent un radical alcoyle ou aryle, de préférence un radical alcoyle comprenant 1 à 4 atomes de carbone, les groupes -OH du dérivé d'oside étant protégés par des groupes appropriés, avec
- un dérivé d'oside (b) constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché (s) à un reste organique, un seul groupe -OH de ce ou ces motifs oses étant libre et occupant l'une quelconque des positions hydroxyle secondaire 1 à 4, les dérivés d'osides a) et/ou b) comprenant un motif avec au moins deux oses.

pour la synthèse de dérivés comprenant des osides branchés.

A cet effet, on procède à la réaction du dérivé a) défini plus haut avec un dérivé d'oside constitué par une ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché(s) à un reste organique, un seul groupe -OH de ce ou ces motifs étant libre et occupant une position hydroxyle 1 à 4 ou 6 permettant la formation d'une chaîne osidique branchée.

Cette réaction est avantageusement utilisable pour la synthèse d'un dérivé d'oside constitué par un trisaccharide branché ou comprenant, rattaché par exemple à un reste organique, un tel trisaccharide branché.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention qui ouvre la voie notamment à l'obtention de substances à propriétés antigéniques, on met en oeuvre, dans les diverses formes d'exécution du procédé ci-dessus, un dérivé d'oside a) constitué par un motif galactopyranose, ou un motif fucopyranose, substitué en position 1 par un groupe O-imidyle tel que défini ci-dessus.

Suivant une disposition complémentaire, le dérivé d'oside b) comprend un motif ose comportant en position 1 une substitution -OA constituée par un groupe fonctionnel, non réactif dans les conditions de la synthèse osidique, rendu non réactif, ou par un groupe fonctionnalisable, c'est-à-dire autorisant au cours ou en fin de synthèse la production de groupements fonctionnels.

Il s'agit par là essentiellement de disposer en position 1 d'un groupe permettant de mettre aisément à profit les propriétés des osides obtenus et ce dans les diverses applications biologiques mettant en jeu les propriétés des déterminants antigéniques.

Des groupes A particulièrement appropriés sont constitués par des radicaux comportant une ou plusieurs liaisons insaturées, tels que les radicaux éthyléniquement insaturés. De préférence, A représente alors un radical alcényle comprenant de 2 à 10 atomes de carbone.

A représentera également des radicaux auxquels peuvent donner lieu, selon les techniques classiques de synthèse organique, la fonctionnalisation de la ou des liaisons in-

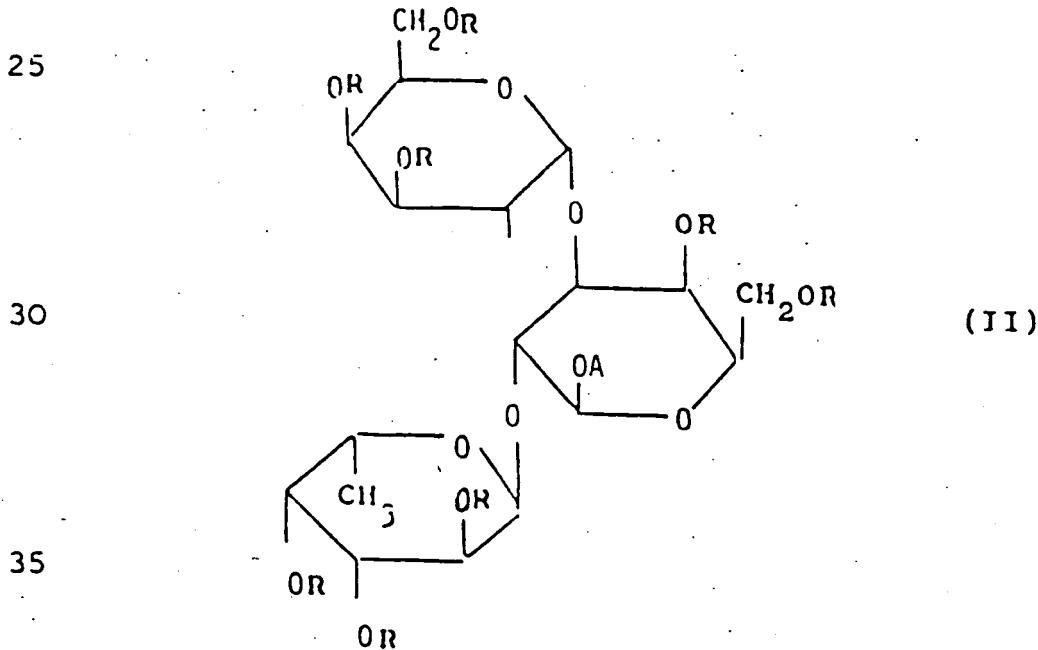
saturées en question. Des radicaux de ce dernier type sont, par exemple, constitués par des radicaux alcoyle, comportant notamment 2 à 10 atomes de carbone, et substitués par au moins un groupe -OH qui, le cas échéant, est protégé par un groupe de blocage ou engagé dans un radical fonctionnel.

A sera également constitué par un groupe fonctionnel renfermant au moins un radical éther et/ou amine.

Plus spécialement, il est avantageux de mettre en œuvre dans le procédé de l'invention des dérivés d'osides b) dans lesquels le groupe hydroxyle en position 1 est substitué par un radical O-allyle, étant donné que ce groupement ouvre la voie à l'introduction d'un grand nombre de groupements chimiques.

Des dérivés b) répondant aux caractéristiques ci-dessus, comprenant un motif galactopyranose et/ou fucopyranose sont particulièrement préférés pour la réalisation des produits de l'invention.

Pour préparer, conformément au mode de réalisation préféré ci-dessus, un dérivé de trisaccharide branché comprenant un enchaînement galactopyranose-galactopyranose-fucopyranose et répondant plus spécialement à la structure II :



benzyliques ou des acétals benzylidéniques,

- A représente un reste organique tel que défini ci-dessus, et

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> présentent les significations données plus haut.

5 De préférence, le substituant A du disaccharide de formule IV est constitué par un radical éthyléniquement insaturé choisi parmi les radicaux alcényle, de préférence, comportant de 2 à 10 atomes de carbone.

10 A peut également être constitué par un radical alcoyle substitué par au moins un groupe -OH qui, le cas échéant, est protégé par un groupe de blocage ou engagé dans un radical fonctionnel.

15 D'une manière particulièrement préférée, on a recours à des groupes R représentant un radical benzyle et, pour les positions 4 et 6, un radical benzylidène, et l'on choisit comme substituant A un radical allyle.

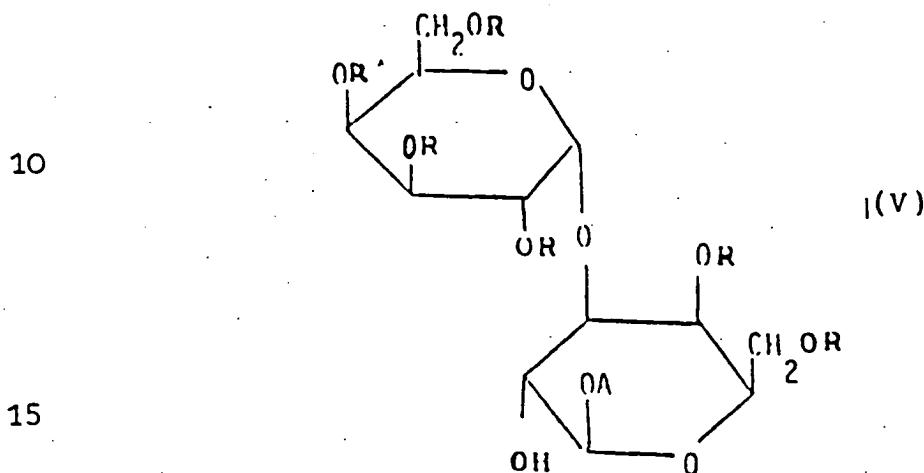
20 Le choix de ces significations pour R et A offre la possibilité d'éliminer A indépendamment de R ou de le traiter, sans que R ne soit touché et de le modifier en un groupement permettant l'utilisation du dérivé dans une application biologique donnée. Ainsi, on peut transformer le groupe allyle représenté par A, notamment, en un groupe β-hydroxyéthyle par exemple sous l'action de tetroxyde d'osmium et de périodate de sodium, dont l'intérêt dans les applications biologiques des produits formés sera souligné ci-après. On dispose ensuite de toute latitude pour éliminer les groupes R lorsqu'on le souhaite.

25 Parmi les larges possibilités de traitement du groupe allyle, on mentionnera encore, à titre d'exemple, sa transformation par hydroboration en un groupe gamma-hydroxypropyle.

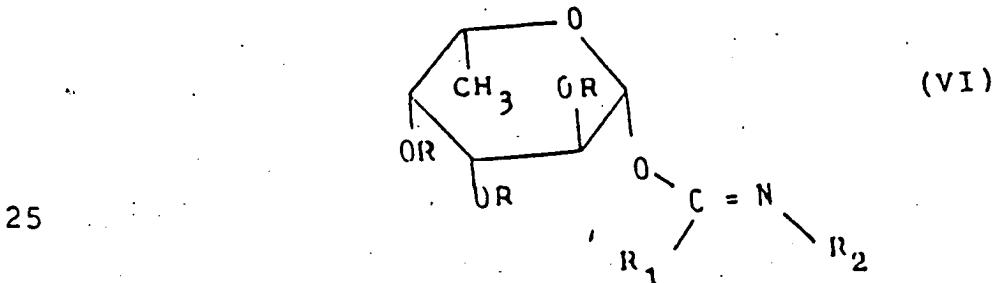
30 De surcroît, de telles chaînes peuvent être traitées pour l'introduction d'un groupement allyle permettant donc l'articulation d'un grand nombre de réactions et la création de chaînes de substitution à caractère huméabilisant.

précieuses pour les applications recherchées.

Selon une variante, pour préparer le dérivé de trisaccharide de formule III, on met en oeuvre, comme disaccharide, un digalactopyranose, comportant un groupement -OH libre en position 2 de l'un des motifs galactopyranose, et répondant à la formule :



et on effectue sa condensation avec le groupe -O-imidyle  
20 d'un 1-O-imidyl- $\beta$ -L-fucopyranose de formule VI :



De ces formules V et VI, R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et A présentent les significations données plus haut.

La mise en oeuvre de ce procédé de synthèse conduit à l'obtention, avec un rendement élevé, de motifs trisaccharides possédant la stéréospécificité souhaitée.

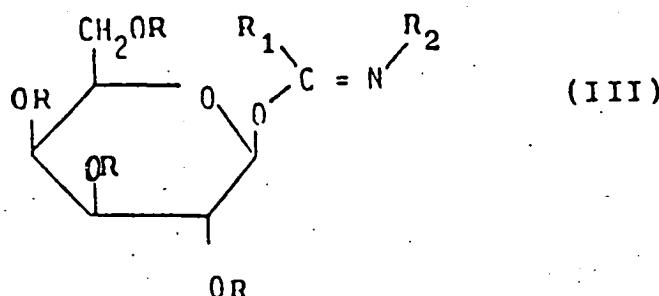
Les condensations du procédé de l'invention sont avantageusement réalisées dans des conditions anhydres et à température ambiante.

On opérera en présence d'un acide fort, peu nucléophile et dans un solvant faiblement nucléophile et inerte.

on fait réagir

- un 1-O-imidyl- $\beta$ -D-galactopyranose de formule III :

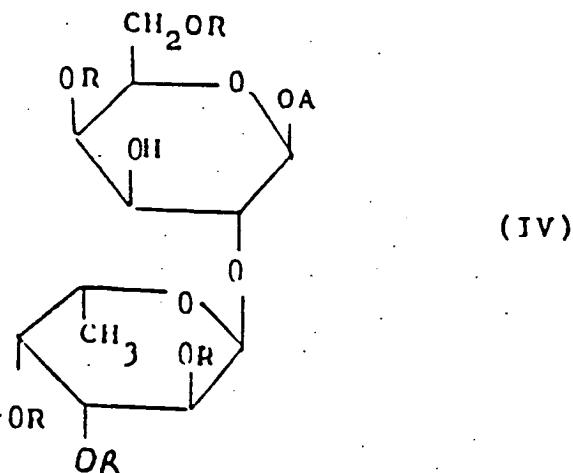
5



10

avec un disaccharide constitué par un fuco-galacto-pyranose comportant un groupement -OH libre en position 3 du motif galactopyranose, ce disaccharide répondant à la formule IV :

15



20

25

Dans ces formules :

30

35

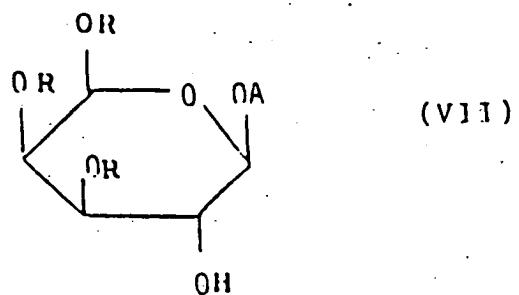
- les substituants R, identiques ou différents les uns des autres, représentent des groupements de protection de radicaux hydroxyle, le cas échéant avec un substituant voisin, et sont choisis parmi des groupes stables, non réactifs dans les conditions habituelles de synthèse osidique et facilement éliminables dans des conditions douces compatibles avec le maintien de la structure osidique, en particulier par des groupes constituant avec l'atome d'oxygène de l'hydroxyle des éthers

De manière avantageuse, on a recours, comme acide, à de l'acide p-toluène sulfonique anhydre.

Quant au solvant, il est avantageusement constitué par du benzène, de l'éther et plus spécialement par du nitrométhane.

Les disccharides mis en oeuvre dans les réactions de condensations ci-dessus sont des produits nouveaux constituant, dans le cadre de l'invention, des intermédiaires de synthèse. Ces disaccharides sont avantageusement préparés selon un procédé relevant du même principe que ces condensations.

Ainsi, pour obtenir le fuco-galactopyranose de formule (IV), on fait avantageusement réagir un galactopyranose comportant un groupe -OH libre en position 2 et répondant à la formule VII :



20

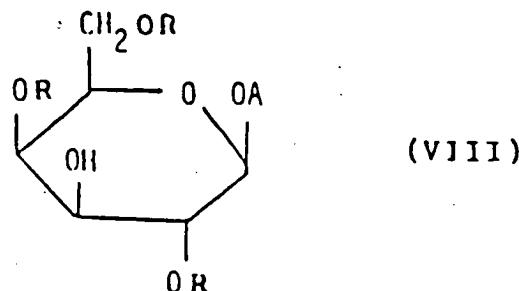
25

avec un fucopyranose de formule VI donnée ci-dessus, puis on procède à l'élimination du groupement R en position 3, dans le motif osse provenant du galactopyranose VI, selon les techniques classiques pour le groupe de blocage représenté par R.

30

De même, le digalactopyranose de formule V est avantageusement obtenu par réaction du galactopyranose de formule VIII, comportant un groupe -OH libre en position 3,

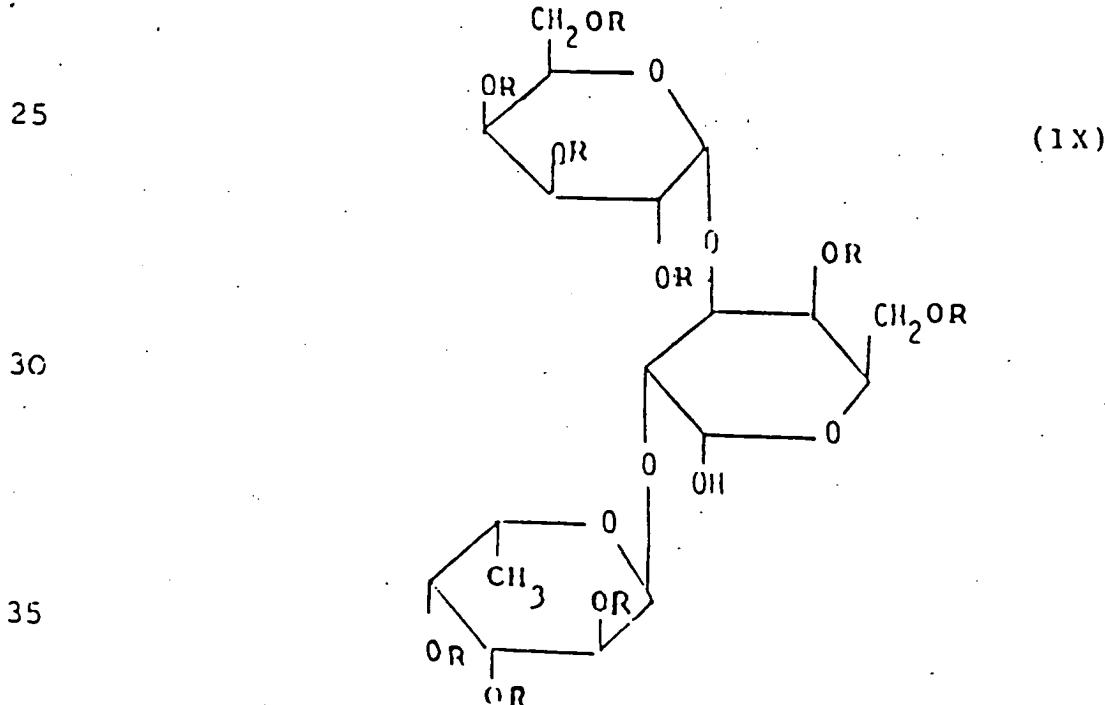
10



10 avec un 1-O-imidyl-galactopyranose de formule III ci-dessus. Le disaccharide ainsi obtenu est ensuite traité, selon les méthodes classiques, de manière à éliminer le groupe R en position 2 dans le motif ose provenant du galactopyranose VIII.

15 Selon un aspect de l'invention revêtant un grand intérêt, le procédé ci-dessus permet la synthèse totale du trisaccharide B.

20 A cette fin, après avoir effectué les condensations entre le disaccharide de formule IV ou V et, respectivement, le monosaccharide de formule III ou VI, on procède à l'élimination séquentielle, dans des conditions douces selon les techniques classiques, du substituant A du produit de structure II obtenu, ce qui conduit à un produit de structure IX :



dont l'hydrogénolyse permet d'obtenir le trisaccharide B.

Chacune des étapes du procédé de synthèse de l'invention se caractérise par un rendement élevé. Leur mise en œuvre permet ainsi d'obtenir des quantités importantes de 5 trisaccharide B ou de trisaccharides substitués.

La mise au point du procédé évoqué ci-dessus conduit, selon un autre aspect de l'invention de grand intérêt, à l'élaboration de nouveaux dérivés d'osides.

10 L'étude de ces nouveaux dérivés a montré qu'ils constituent, grâce à leurs caractéristiques chimiques, des substances de synthèse analogues aux antigènes B de groupe sanguin ; d'une manière avantageuse, ces dérivés ouvrent également la voie à l'obtention de produits antigéniques.

15 Les nouveaux osides de l'invention comportent au moins un motif galactopyranose dans lequel l'atome d'hydrogène du groupe -OH en position 1 est substitué par un radical A représentant un groupe alcoyle substitué par au moins un groupe hydroxyle, le cas échéant protégé par un groupe de blocage ou engagé dans un radical fonctionnel, ou encore 20 un groupe comportant une ou plusieurs liaisons insaturées, en particulier un radical éthyléniquement insaturé choisi parmi les radicaux alcényle, et plus spécialement les radicaux alcényle à 2 à 10 atomes de carbone, A pouvant comporter, en outre, un ou plusieurs groupements éther et/ou amine,

25 Dans un groupe préféré de dérivés d'osides selon l'invention, A représente un radical alcoyle comportant 2 à 10 atomes de carbone, substitué par au moins un groupe hydroxyle, et avantageusement choisi parmi les radicaux alcoylèneglycol ou hydroxyalcoyle.

30 Des produits dans lesquels A représente un groupe  $\alpha$ - $\beta$  dihydroxypropyle,  $\beta$ -hydroxyéthyle ou  $\gamma$ -hydroxypropyle constituent des réactifs biologiques et sont également spécialement intéressants dans les applications biologiques faisant intervenir leur fixation sur une protéine ou un support insoluble, par exemple, pour la constitution 35

Dans un autre groupe préféré de dérivés d'osides selon l'invention, A représente un radical alcényle comportant 2 à 10 atomes de carbone, en particulier un radical allyle. La réactivité de ce radical s'avère tout spécialement avantageuse dans la conduite de la synthèse osidique proprement dite, dans la mesure où A peut être traité indépendamment des groupes de blocage utilisés pour les groupements hydroxyle des motifs oses. L'intérêt de la signification allyle de A réside également dans le jeu de possibilités offert pour l'introduction d'un groupement fonctionnel donné selon les applications envisagées. De plus, on notera que le dérivé allylique peut être utilisé tel quel comme réactif biologique par exemple pour neutraliser les hémolysines.

D'autres produits préférés de l'invention comportent un groupement A comprenant au moins une fonction éther et au moins un groupement éthyléniquement insaturé, avantageusement un groupement allyle. Dans ce groupe de produits A peut représenter, par exemple une chaîne alcoxy-alcényle et notamment alcoxy-allyle, le groupe alcoxy comprenant un nombre variable d'atomes de carbone, généralement inférieur à 10 et plus spécialement de l'ordre de 3.

Dans un autre groupe de produits, A est une chaîne de substitution du type alcoxy-alcool, alcoxy-ester amide ou -amine ou alcoyl-amide, ou alcoxy-acide carboxylique, ces différents groupes chimiques pouvant comporter, en outre, une fonction amine intercalaire.

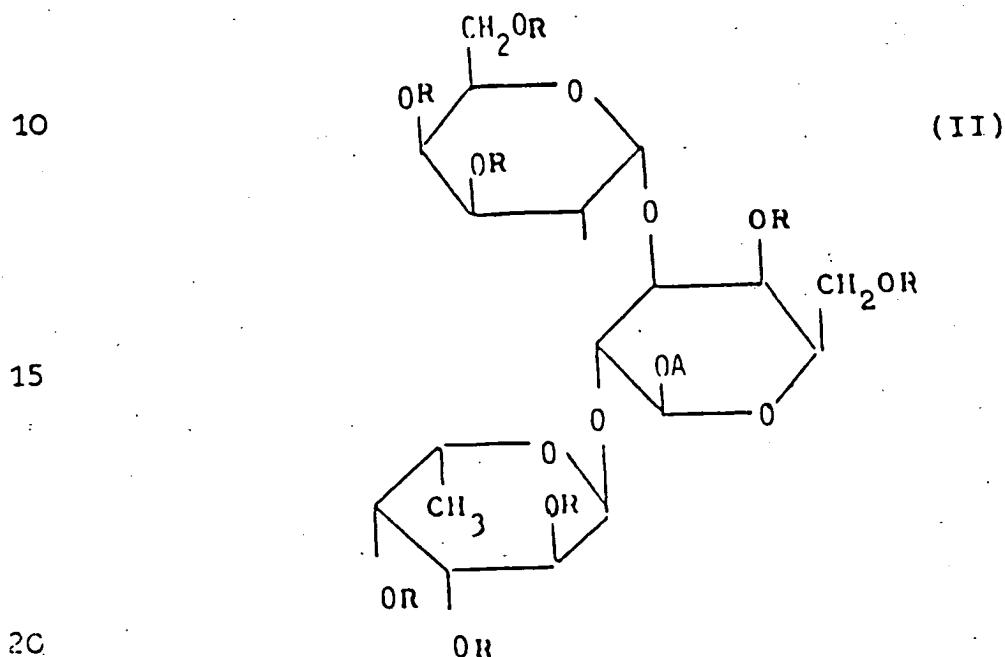
Les motifs galactopyranose définis ci-dessus sont avantageusement impliqués dans une chaîne trisaccharide linéaire ou branchée comprenant un motif fucopyranose et un autre motif galactopyranose.

Dans ces chaînes trisaccharides, les groupements hydroxyle des différents motifs oses sont libres ou protégés par des groupes de blocage choisis parmi des groupes stables, non réactifs dans les conditions habituelles de synthèse osidique et facilement éliminables dans des conditions douces compatibles avec le maintien de la structure osidique.

Les trisaccharides répondant aux caractéristiques

définies ci-dessus, et plus spécialement les trisaccharides branchés constitués d'un motif galactopyranose, comportant un substituant A tel qu'évoqué ci-dessus, simultanément substitué par un autre motif galactopyranose et par un motif fucopyranose sont préférés.

En particulier, l'invention vise les trisaccharides branchés de formule II



dans laquelle :

- les substituants R, identiques ou différents les uns des autres, représentent, le cas échéant, avec un substituant voisin des groupes de protection de radicaux hydroxyle et sont choisis parmi des groupes stables, non réactifs dans les conditions habituelles de synthèse osidique et facilement éliminables, dans des conditions douces compatibles avec le maintien de la structure osidique, en particulier par des groupes benzyle ou benzylidényle, ou représentent un atome d'hydrogène;
- A représente un reste organique comportant au moins un groupe fonctionnalisable et constitué par un radical éthyléniquement insaturé choisi parmi les radicaux alcényle, de préférence de 2 à 10 atomes de carbone, et plus parti-

culièrement constitué par le radical allyle, ou encore par un radical hydroxyalcoyle, plus spécialement  $\beta$  ou  $\gamma$  hydroxyalcoyle dans lequel le groupe -OH est éventuellement protégé ou un radical alcoxy-alcényle, alcoxy-alcool ou amine ou -amide alcoxy, alcoxy alcoylamine ou amide ou alcoxy-acide carboxylique, ces différents groupes chimiques pouvant comporter en outre une fonction amine intercalaire.

10 Comme indiqué ci-dessus, ces nouveaux osides sont eux-mêmes ou constituent des intermédiaires de grand intérêt pour l'obtention de produits à propriétés de groupes sanguins en particulier du trisaccharide B ou des produits comportant sa structure.

15 L'invention fournit donc les moyens permettant d'obtenir des homologues de synthèse d'antigène B. Elle fournit également des produits qui constituent de tels homologues. Les trisaccharides de formule II dans laquelle R est un atome d'hydrogène s'avèrent en effet particulièrement précieux à cet égard.

20 La possibilité de disposer, grâce au procédé de l'invention, des osides en question sous une forme extrêmement pure confère encore plus d'intérêt à leurs propriétés, en particulier dans leurs applications biologiques, notamment en immunohématologie et plus spécialement pour la détermination de groupes sanguins.

25 On mesurera tout l'intérêt de disposer, par exemple, au niveau de la pratique transfusionnelle, de tels produits de synthèse en considérant le processus utilisé à ce jour pour la détermination de groupes sanguins.

30 Selon les techniques les plus courantes, ces déterminations s'effectuent à l'aide de sérum-tests d'origine humaine ou produits par immunisation d'animaux.

35 Pour effectuer la détermination systématique du groupe Rhésus standard (antigène D), plusieurs milliers de litres d'antisérum anti-D sont utilisés chaque année en France. Par que la spécificité de ce réactif d'origine humaine soit rigée uniquement contre l'antigène D, il est nécessaire d'absorber les anticorps naturels anti-A et anti-B, initialement présents dans ce

ou B de groupe Rhésus négatif. Plusieurs milliers de litres de sang du groupe B Rhésus négatif sont utilisés à cet effet. Ceci représente non seulement des manipulations de très gros volumes, mais surtout entraîne l'utilisation d'un sang relativement rare.

Ainsi, en France, 1,2% de la population seulement appartient au groupe B Rhésus négatif. Ceci a comme conséquence de provoquer une "pénurie", créée artificiellement, de flacons de sang de ce groupe destinés à la transfusion sanguine.

Les nouveaux trisaccharides de formule II de l'invention dans lesquels R représente un atome d'hydrogène constituant précisément une solution à ce problème de "pénurie" de flacons de sang appartenant à des groupes précieux pour la transfusion sanguine.

En effet, par fixation sur un support solide de ces nouveaux trisaccharides, dotés d'une capacité d'absorption élevée, l'invention fournit un modèle artificiel, qui peut être régénéré, des globules B Rhésus négatif.

Le même type de composé peut être utilisé pour résoudre d'autres problèmes où intervient une fréquence encore plus rare de combinaisons de systèmes de groupe sanguin.

Par exemple, certains sujets appartiennent au groupe exceptionnel négatif pour l'antigène cellano (système Kell) et sont susceptibles de développer un anticorps anticellano pouvant être utilisé comme sérum test pour l'antigène cellano. Selon le processus de détermination classique de groupes sanguins, les anticorps naturels anti-B de ces sujets sont absorbés à l'aide de globules rouges d'un sujet de groupe B, cellano négatif. Si l'on considère qu'une telle combinaison ne se trouve que 1,7 fois sur 10.000, on mesure l'intérêt indéniable de l'invention.

Il est clair que l'utilisation à la place de ces globules rouges, pour jouer le même rôle, de l'immunoabsorbant de l'invention définie ci-dessus présente un intérêt tout particulier.

De plus, il est possible de disposer de séums test

spécifiques, grâce aux immunoabsorbants de l'invention dotés d'une capacité d'absorption d'anticorps élevés, inversement, après l'élution en milieu acide des anti-B fixés sur les immunoabsorbants et concentration, on récupère avec des titres élevés les anticorps anti-B, ce qui augmente l'intérêt économique des produits de l'invention.

Dans ces applications, on pourra avantageusement avoir recours aux supports utilisés habituellement dans ce type de technique et plus spécialement à des polymères insolubles tels que de la cellulose, de l'agarose ou des dérivés de ces composés.

D'une manière générale, les osides de l'invention plus spécialement les trisaccharides de formule II définie ci-dessus, sont utilisables *in vitro* et *in vivo* grâce à leur innocuité et à leur non immunogénicité, et ce dans les diverses réactions immunologiques mettant en jeu les propriétés du déterminant antigénique B.

L'invention fournit ainsi de précieux réactifs biologiques utilisables sous forme immobilisée, mais également tels quels. L'étude de ces dérivés sous leur forme libre a montré notamment leur capacité élevée de neutralisation des hémolysines anti-B. Ces dérivés sont donc avantageusement utilisables pour la détection et la neutralisation des hémolysines anti-B en remplacement des substances de groupes sanguins isolées à partir de mucine d'estomac de porc ou de cheval.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description donnée dans les exemples.

Les points de fusion donnés dans ces exemples sont mesurés dans un tube capillaire au moyen d'un appareil Büchi et ne sont pas corrigés. Les pouvoirs rotatoires sont déterminés avec, comme polarimètre, le modèle 141 commercialisé par Perkin-Elmer. Les spectres infrarouge (IR) sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre IRA-1 de

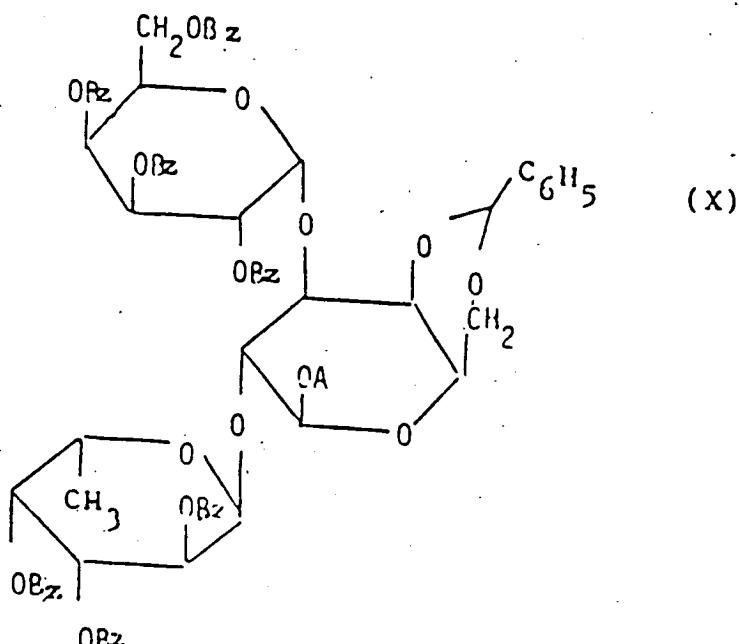
Jouan-Jasco et les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'aide d'un spectromètre Perkin-Elmer R-32 (90MHz). En ce qui concerne les résultats relatifs à la RMN on indique les déplacements chimiques ( $\delta$ ) par rapport au tétraméthylsilane interne ; les protons de l'unité L fucopyranose sont affectés d'un indice prime, ceux de l'unité D-galactopyranose non réductrice d'un indice seconde. Les chromatographies sur colonne sont effectuées au moyen de gel de silice Merck (granulométrie 0,063-0,200 mm).

EXEMPLE 1.— Préparation du trisaccharide allyl-2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside de formule X ;

15

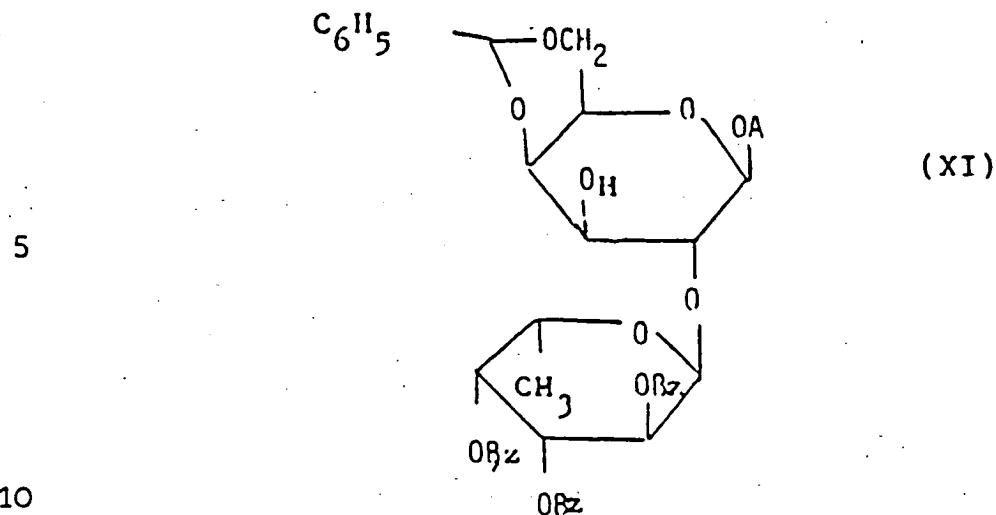
20

25

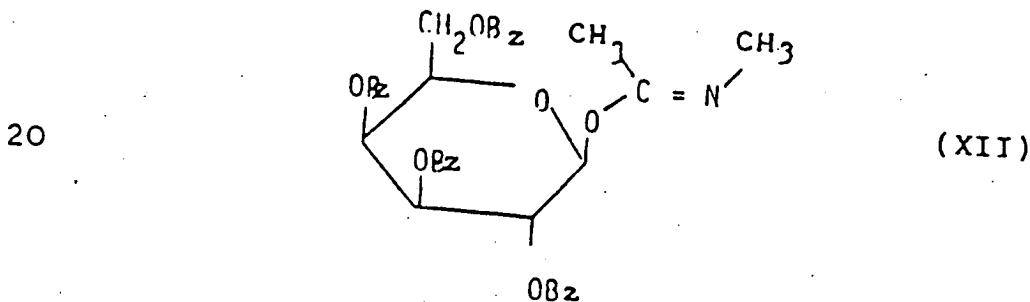


30 dans laquelle Bz représente le radical benzyle.

Pour élaborer le trisaccharide de formule X, on fait réagir un disaccharide, à savoir un fucogalactopyranose de forme XI, l'allyl-3-O-benzoyl-2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside



avec le 1-O-imidyl-galactopyranose de formule XII  
 (1-O-(N-méthyl)-acétimidyl-2,3,4,6-tétra-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranose).



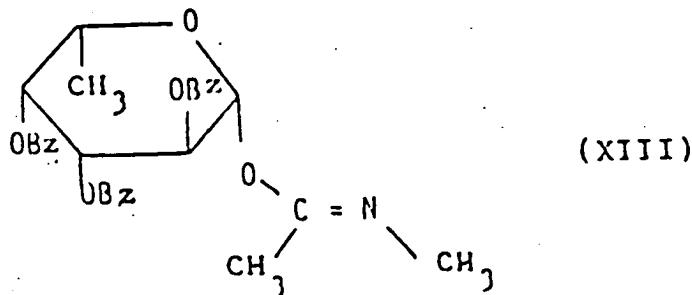
Préalablement à cette réaction de condensation, on procède à la préparation du disaccharide XI d'une part, et du 1-O-imidyl galactopyranose XII, d'autre part, en opérant comme suit.

30 1.- Préparation du disaccharide XI.

Le disaccharide XI est obtenu par condensation du fucopyranose de formule XIII (le 1-O-(N-méthyl)-acétimidyl-2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -L-fucopyranose)

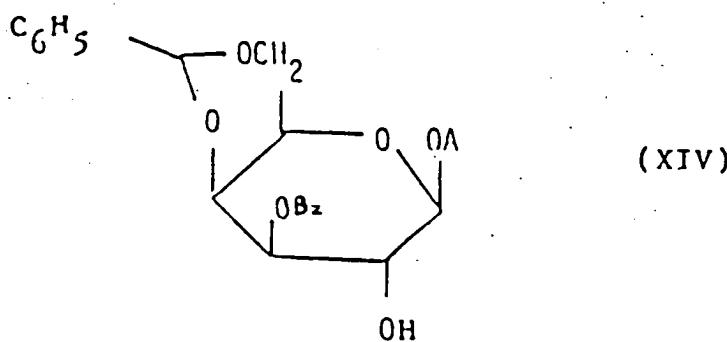
19

5



10 avec l'allylgalactopyranose de formule XIV (l'allyl-3-O-benzoyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside)

15

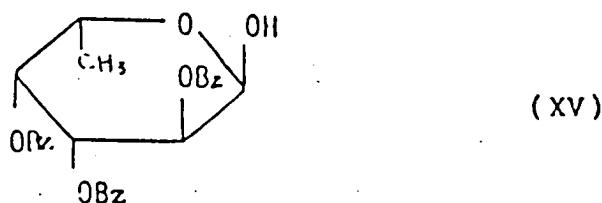


20

a) Préparation du 1-O-(N-méthyl)-acétimidyl-2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -L-fucopyranose de formule XIII.

On dissout 434 mg de 2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranose de formule XV

25



dans 10 ml de dichlorométhane puis on ajoute 2,5 équivalents de chlorure de diméthylchloroformiminium. Le mélange réactionnel est soumis à agitation à l'abri de l'humidité puis est filtré au bout de 40 mn, sur une courte colonne de gel de silice et évaporé. On obtient du chlorure de 2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyle (rdt 96%), qui est engagé directement dans la fabrication du 1-O-(N-méthyl)-acétimidyl fucopyranose.

On ajoute 434 mg de chlorure de fucopyranosyle et 190 mg d'éthyldiisopropylamine à 10 ml d'une solution benzénique anhydre, renfermant 81 mg de N-méthylacétamide, agitée sous azote sec et à l'abri de la lumière, en présence de 580 mg d'oxyde d'argent et de tamis moléculaires 4 Å. Au bout de 20 h, le milieu réactionnel est filtré sur lit d'alumine neutre, lequel est lavé avec 250 mg d'éther contenant 0,1% de triéthylamine. Le filtrat et la phase éthérée sont évaporés à sec et le résidu solide (462 mg, 94%) est cristallisé dans l'hexane, donnant l'imidate recherché (431 mg, 88%).

P.F. 89-90°C ;  $[\alpha]_D^{20} = -67^\circ$  (c 1,benzène) ; R.M.N.(chloroformé-d) :  $\delta$  1,18 (3H,d,7 Hz, Me-C), 1,84 (3H,s,Me-C), 2,97 (3H,s,Me-N), 5,80 (1H,d,J<sub>1,2</sub> 8Hz,H-1), 7,30-7,35 (15H,m,Ph); anal : calc. pour C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>5</sub> : C : 73,59 ; H : 7,20 ; N : 2,86 ; O : 16,34 ; trouvé : C : 73,72 ; H : 7,33 ; N : 2,92 ; O : 16,19.

b) Préparation de l'allyl-galactopyranose de formule XIV  
 Elle est réalisée par action d'aldéhyde benzoïque en présence de chlorure de zinc sur de l'allyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ce qui conduit à l'allyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside qu'on soumet à une réaction de benzylation. Ces étapes sont effectuées comme suit :  
 α) allyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

On soumet à agitation un mélange de 6 g d'oxyde mercurique, de 0,4 g de bromure mercurique et de 10 g de driérite pendant 30 mn à la température ambiante et à l'abri de l'humidité en présence/ <sup>de</sup> 80 ml de 1,2-dichloro-

éthane et d'alcool allylique fraîchement distillé. 12g de bromure de 1,2,3,4-tétra-O-acétyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyle sont alors ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant 12 h. Les solides sont essorés et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 200 ml de chloroforme et la solution obtenue est lavée avec une solution aqueuse à 10% d'iodure de potassium, avec de l'eau, séchée ( $\text{CaCl}_2$ ) et évaporée. Le résidu est dissous dans 100 ml de méthanol et 3 ml d'une solution molaire de méthylate de sodium dans le méthanol sont ajoutés. Au bout d'une heure, le milieu réactionnel est neutralisé (résine acide) et évaporé. Le résidu est cristallisé dans l'éthanol, donnant l'allyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (5,2 g, 81%) ; P.F. 103-104°C ;  $[\alpha]^{20} = -19^\circ$  ( $c$  1, MeOH) ;

b) allyl-4,6,O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside -

On soumet ensuite 5,96 g d'allyl- $\beta$ -D-galactopyranoside à une forte agitation pendant 12 h en présence de 80 ml d'aldéhyde benzoïque et de 5,5 g de chlorure de zinc. Le milieu réactionnel est alors lentement versé sous forte agitation dans 300 ml de disopropyléther. Le précipité formé est essoré au bout de quelques heures et lavé avec 100 ml d'éther environ. Le solide obtenu est cristallisé dans de l'éthanol, donnant l'allyl-4,6,O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside (6,92g, 82%) ; P.F. 178-179°C,  $[\alpha]^{20}_D = -7^\circ$  ( $c$  1, pyridine) ; anal.: calc. pour  $C_{16}H_{20}O_6$ ,  $H_2O:C:58,88, H:6,79$ ; O:34, 31; trouvé : C; 58,94; H:6,47; O:34,09. Ce produit a été caractérisé par un di-O-acétate : P.F. 94-95°C  $[\alpha]^{20}_D = +56^\circ$  ( $c$  1, chloroforme) anal.cal. pour  $C_{20}H_{24}O_8$ : C:61,22 = H:6,16; O:32,62; trouvé : C: 61,31; H: 6,12; O:32,77.

30) allyl-3-O-benzoyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside. On ajoute à 5 ml d'une solution chloroformique anhydre renfermant 443 mg d'imidazole, une solution de 457 mg de chlorure de benzoyle dans 2 ml de chloroforme à 5°C. Au bout de 10 mn, le chlorhydrate d'imidazole formé est essoré et lavé avec 5 ml de chloroforme. 20ml d'une solution chloroformique anhydre d'allyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside (1g) est alors ajoutée au filtrat et le milieu réactionnel

22

à 75°C, pendant 18h environ. Après refroidissement à la température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec 50ml de chloroforme, lavé avec une solution aqueuse diluée de bicarbonate, avec de l'eau, séché ( $\text{CaCl}_2$ ) et évaporé.

5 Le résidu est cristallisé dans le mélange acétate d'éthyle-éther, donnant le composé de formule XIV (1,14 g, 85%), P.F. 172-173°,  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = + 83^\circ$  ( $\text{c}$  1, chloroform).  
 anal. calc. pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$  : C : 66,98 ; H : 5,87 ; O : 27,16.  
 trouvé : C : 67,01 ; H : 5,75 ; O : 27,37.

c) Condensation des produits obtenus sous a) et b).  
 On soumet à agitation une solution de 619 mg du dérivé de formule XIV dans 20 ml de nitrométhane anhydre pendant 3 h à l'abri de l'humidité et sous azote sec en présence de tamis moléculaires 4 Å en poudre (1 g). On ajoute à cette solution réactionnelle 1,222 g d'acétimidylfucopyranose XIII et 344 mg d'acide *p*-toluènesulfonique et l'on poursuit l'agitation pendant 20 h. Le milieu réactionnel est alors neutralisé avec de la triéthylamine et filtré. Le filtrat est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de 150 g de gel de silice à l'aide du mélange hexane-acétate d'éthyle (5:2, v/v). L'allyl-3-O-benzoyl-2-O-2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside est obtenu à l'état pur (1,131 g, 91%),  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = + 13^\circ$  ( $\text{c}$  1, chloroform), R.M.N. (chloroform-*d*) :  $\delta$  1,12 (3H, d, 7Hz, Me-C), 7,00-7,55 (20H, m, Ph).  
 anal : calc. pour  $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{O}_{11}$  : C : 72,44 ; H : 6,32 ; O : 21,23.  
 trouvé : C : 72,66 ; H : 6,32 ; O : 21,27.

Ce disaccharide est soumis à une réaction de O-débenzylation selective en procédant comme suit :  
 On dissout 1,03 g du dérivé de galactopyranoside en question dans 20 ml de méthanol et l'on ajoute 1 ml d'une solution méthanolique molaire de méthylate de sodium. Au bout d'une heure, le milieu réactionnel est concentré et versé dans de l'eau glacée. La phase obtenue est extraite avec du

chloroforme, les extraits chloroformiques étant ensuite lavés avec de l'eau, séchés ( $\text{CaCl}_2$ ) et évaporés. Le résidu est cristallisé dans le mélange acétate d'éthyle-éther-hexane, donnant l'allyl-2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-

5  $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside (847 mg, 94%) ; P.P. 166-167°C,  $[\alpha]_D^{20} = -58^\circ$  ( $\text{C}, 1$ , chloroforme), spectre R.M.N. (chloroforme-d) :  $\delta$  1,12 (3H, d, 7Hz, Me-C), 5,26 (1H, d,  $J_{1,2}$  2,4Hz, H-1'), 7,15-7,65 (20H, m, Ph).

10 anal : calc. pour  $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{O}_{10}$  : C : 71,52 ; H : 6,67 ; O : 22,07.

trouvé : C : 71,68 ; H. 6,63 ; O : 22,15.

2) Préparation du 1-O-(N-méthyl)-acétimidyle formule XII.

15 Cet imidate est préparé à partir du 2,3,4,6-tétra-O-benzyl-D-D-galactopyranose selon la méthode décrite sous 1-b). Le chlorure de 2,3,4,6-tétra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyle formé intermédiairement est obtenu avec un rendement de 93%,  $[\alpha]_D^{20} = + 151^\circ$  ( $\text{C} 2,5$  benzène). L'imidate est obtenu avec

20 un rendement de 92%,  $[\alpha]_D^{20} = + 25^\circ$  ( $\text{C} 1$ , chloroforme), spectre R.M.N. (chloroforme-d) :  $\delta$  1,84 (3H, s, Me-C), 2,95 (3H, s, Me-N), 5,83 (1H, d,  $J_{1,2}$  8 Hz, H-1'), 7,30 (20H, m, Ph).

Anal : calc. pour  $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{NO}_6$  : C : 74,60 ; H : 6,94 ; N : 2,35 ; O, 16,12.

25 trouvé : C : 74,68 ; H : 6,91 ; N : 2,10; O : 16,31 .

3) Condensation des produits sous 1) et 2).

On soumet à agitation pendant 5 h, en présence de tamis moléculaires 4 Å (1g) et sous atmosphère d'azote sec, une solution du composé allyl-2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside (600 mg) et 900 mg de l'acétimidate de formule XII dans 15 ml de nitrométhane. On ajoute ensuite une solution d'acide p-toluenesulfonique anhydre (150 mg) dans 5 ml de nitrométhane. Le mélange réactionnel est soumis à agitation pendant 48 h à la température ambiante. Après addition de 1 ml de triéthylamine, le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu

dissous dans 50 ml de chloroforme, la solution étant lavée avec une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium, avec de l'eau, séchée ( $\text{CaCl}_2$ ) et évaporée. Le résidu est chromatographié sur une colonne de 80 g de 5 gel de silice à l'aide du mélange hexane-acétate d'éthyle (5:2, v/v), conduisant au composé de formule X (90 mg, 88%) qui est cristallisé dans l'éthanol à 95% (865 mg, 84%), P.F.  $117\text{--}118^\circ[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$  ( $\underline{\text{C}}$  1, chloroforme), spectre R.M.N. (chloroforme-d) :  $\delta$  1,18 (3H, d, 7 Hz,  $\text{CH}_3\text{-C}$ ), 10 7,05-7,55 (40H, m, Ph)

anal. calc. pour  $\text{C}_{77}\text{H}_{82}\text{O}_{15}$  : C: 74,13 ; H: 6,62 ; O: 19,24.

trouvé : C: 74,22; H: 6,64; O: 19,54.

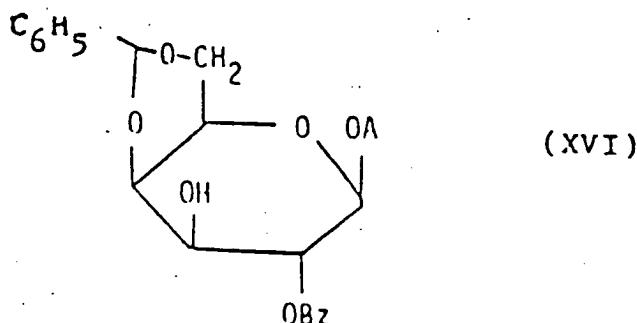
#### EXEMPLE 2

15 Selon une variante, on prépare le produit de formule X en effectuant :

1/ La condensation de l'imidylgalactopyranose de formule XII avec l'allyl-galactopyranose de formule XVI (l'allyl 2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranose) :

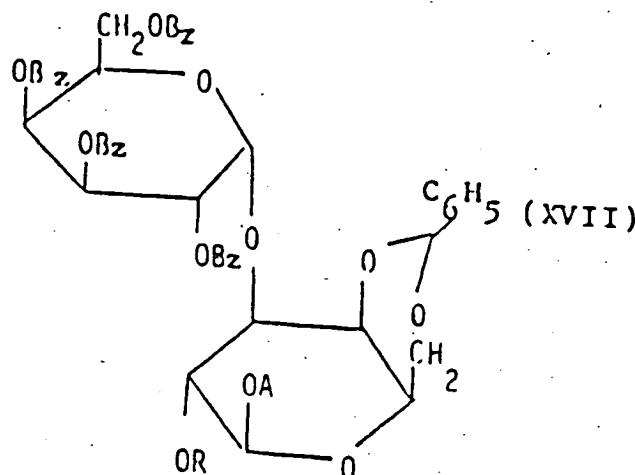
20

25



ce qui conduit au disaccharide allyl-2-O-benzoyl-3-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside de formule :

25



puis

2/ La condensation du disaccharide de formule XVII préalablement O-débenzoylé, avec l'imidyl-fucopyranose de formule XIII.

15

1) Condensation de l'imidyl-galactopyranose de formule XII avec l'allylgalactopyranose de formule XVI

a) on prépare tout d'abord l'allyl-2-O-benzoyl-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside en procédant comme suit :

20

On ajoute 50 ml d'une solution glacée d'hydroxyde de soude à 15 ml d'une solution d'acétone renfermant 1,5 g du composé de formule XIV. On extrait au bout de deux minutes le milieu réactionnel avec 80 ml de chloroforme, les extraits organiques étant lavés avec de l'eau, séchés avec  $\text{CaCl}_2$  et évaporés. Le résidu est soumis à une chromatographie sur une colonne de 80 g de gel de silice à l'aide du mélange acétate d'éthyle-hexane (1 : 1, v/v). On obtient ainsi le produit de départ (782 mg, 52%) et le dérivé recherché (661 mg, 44%), P.F. 144-145°C,  $[\alpha]^{20} = + 10,2^\circ$  (c 1, chloroforme).

25

anal. : calc. pour  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$  : C : 66,98 ; H : 5,87 ; O : 27,16.

trouvé : C : 67,04 ; H : 6,03 ; N : 27,12.

30  
35 b) on effectue la galactosylation du galactopyranoside ainsi formé à l'aide du composé de formule XII. On opère selon la technique précédemment décrite en mettant en œuvre 285 mg du composé de formule XII et 100 mg du composé de formule XVI dans 10 ml de chloroforme et 1 ml de méthanol. L'opération est répétée deux fois.

l'imide.

Après purification sur une colonne de gel de silice (établie avec 40 g de silice et un mélange acétate d'éthyle-hexane 2 : 1 v/v), on obtient 594 mg du disaccharide recherché, ce qui correspond à un rendement de 95%.

5 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 80,5° (c 1, chloroforme), spectre R.M.N.

(chloroforme-d) : δ 4,63 (1H,d,J<sub>1,2</sub> 9Hz,H-1), 5,13 (1H,d,J<sub>1,2</sub> 4Hz,H-1').

10 anal : calc. pour C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>O<sub>12</sub> : C : 73,21 ; H : 6,25 ; O : 20,53.

trouvé : C : 73,06 ; H : 6,02 ; O : 20,71.

c) le disaccharide obtenu est soumis à une O-débenzoylation sélective.

15 On dissous 580 mg du disaccharide dans 20 ml de méthanol, puis on le traite par 1 ml d'une solution méthanolique 1 M de méthylate de sodium. 12 heures après, on concentre le milieu réactionnel, dilué avec 50 ml de chloroforme, puis on le lave avec de l'eau, on le sèche

20 avec CaCl<sub>2</sub> et on évapore. Le résidu est cristallisé dans le méthanol à 95°. On obtient 479 mg, rendement 93% du disaccharide O-débenzoylé. P.F. 150-151°C,

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 44° (c 1, chloroforme), spectre R.M.N.

(chloroforme-d) : δ 2,86 (1H,d,J 3 Hz,OH), 5,21 (1H,d,J<sub>1,2</sub> 4Hz,H-1'), 7,10-7,60 (25H,m,Ph),

25 anal : calc. pour C<sub>50</sub>H<sub>54</sub>O<sub>11</sub> : C : 72,27 ; H : 6,55 ; O : 21,18.

trouvé : C : 72,46 ; H : 6,52 ; O : 21,29.

d) Selon la technique décrite ci-dessus, on prépare le trisaccharide de formule X en condensant le disaccharide de formule XVII avec l'imide cristallin de formule XIII, mis en oeuvre respectivement à raison de 275 et 325 mg. On obtient 370 mg de trisaccharide, ce qui correspond à un rendement de 79%. P.F. 115-116°C,

35 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 2° (c 1, chloroforme.)

### EXEMPLE 3

Préparation du 2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl-2-L-fucopyranosyl)-

-3-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)4,6-O-benzylidène-D-galactopyranose, de formule :

5

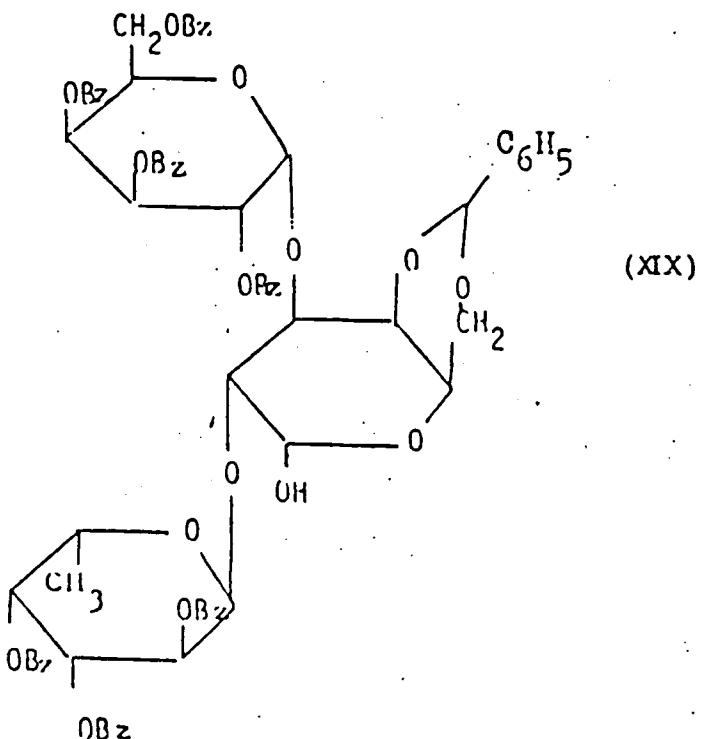
10

15

25

30

35



On dissout 624 mg de trisaccharide de formule X dans  
 20 10 ml de diméthylsulfoxyde. Le mélange réactionnel ainsi  
 formé est soumis à l'agitation pendant environ 4 h à  
 100°C, en présence de 294 mg de tert-butoxyde de potas-  
 sium. Après refroidissement à la température ambiante,  
 on verse le milieu réactionnel dans une solution  
 aqueuse glacée à 10% de chlorure d'ammonium ; cette  
 solution est extraite avec 60 ml de chloroforme, les  
 extraits chloroformiques étant lavés avec de l'eau,  
 séchés avec CaCl<sub>2</sub> et évaporés. On dissout le résidu  
 dans 20 ml d'un mélange acétone-eau (9:1, v/v), puis  
 on soumet la solution à agitation pendant 30 mn en  
 présence de 428 mg d'oxyde mercurique jaune et de  
 271 mg de chlorure mercurique. Après filtration, on  
 lave le milieu réactionnel avec une solution aqueuse  
 à 10% d'iodure de potassium, avec de l'eau, on le  
 sèche avec CaCl<sub>2</sub>, puis on évapore. Le résidu est sou-  
 mis à une chromatographie sur une colonne de gel de

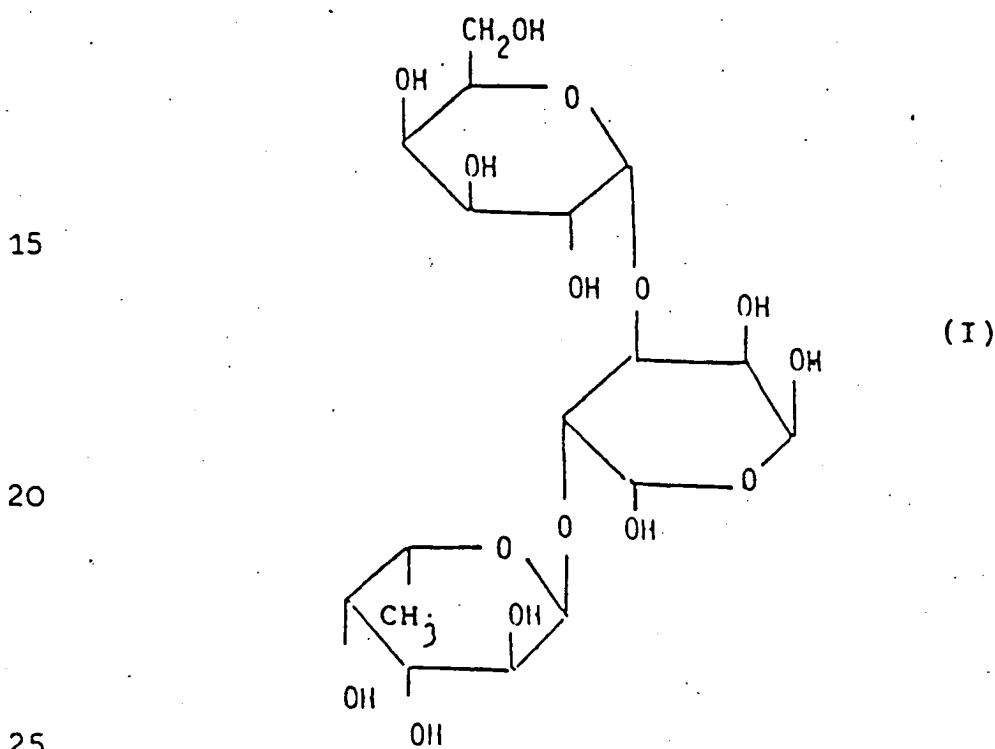
On obtient ainsi 495 mg du trisaccharide recherché (rendement 82%) sous forme d'une mousse incolore  $[\alpha]^{20} + 50^\circ$  ( $c$  1, méthanol), spectre R.M.N. (chloroforme-d)<sup>D</sup>:  $\delta$  2,99 (3H,d,7 Hz,CH<sub>3</sub>-C) , 5,56 (1H,s,CH Ph), 7,05-7,65 (4OH,m,Ph).

5    anal : calc. pour C<sub>74</sub>H<sub>78</sub>O<sub>15</sub> : C, 73 : 61 ; H : 6,51 ; O : 19,87.

trouve : C : 73,80 ; H : 6,58 ; O : 20,06.

EXEMPLE 4

Préparation du trisaccharide B ou 2-O-( $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-10  
10    O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-D-galactopyranose de formule :



30    On soumet 480 mg du trisaccharide de formule XIX à une hydrogénolyse pendant environ 20 h à la température ambiante et à la pression atmosphérique dans 20 ml d'acide acétique en présence de 500 mg de palladium sur charbon. Après essorage du catalyseur, le filtrat est évaporé à sec à une température inférieure à 35°C, donnant le trisaccharide recherché (186 mg, 96%) sous la forme d'une

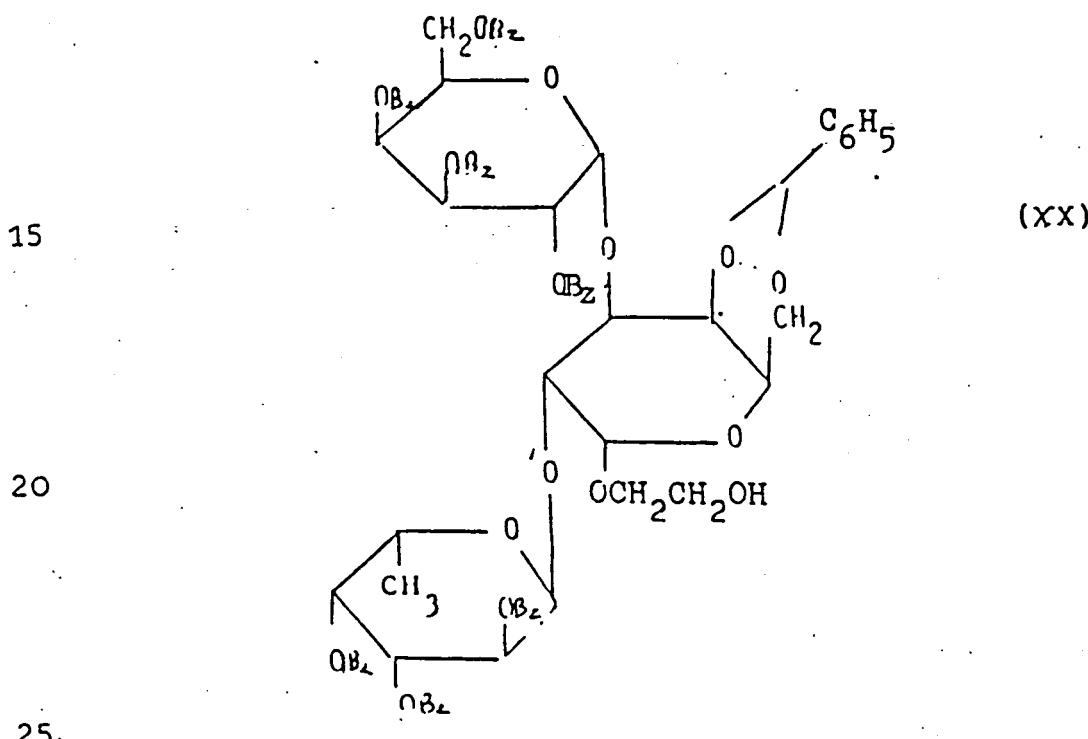
35    20

( $\underline{c}$  1, eau : méthanol, 19:1, v/v), spectre R.M.N.

(D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  1,70 (3H, d, 7 Hz, CH<sub>3</sub>-C).

Ce composé est caractérisé par un peracétate cristallin,  
 P.F. 215-216°C,  $\alpha_{D}^{20} = +51^\circ$  ( $\underline{c}$  1, chloroforme) spectre  
 5 R.M.N. (chloroforme-d) :  $\delta$  1,17 (3H, d, 6,5 Hz, Me-C), 1,90-2,20  
 (3OH, m, Ac), 6,40 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 3,5 Hz, H-1, anomère  $\alpha$ ).

EXEMPLE 5 Préparation du  $\beta$ -hydroxy-éthyl-2-O-(2,3,4-tri-  
 10 O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -  
 D-galactopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside  
 de formule XX



On agite à température ambiante 312 mg de trisaccharide X (0,25 mole) dans 16 ml d'un mélange dioxanne-eau (3:1, v/v) auquel on ajoute 1,25 mg de tétr oxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>). Au bout d'une heure, on ajoute 112 mg de periodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>), 2,1 éq., puis on agite 4 h environ. On ajoute 50 mg de borhydrure de sodium (NaBH<sub>4</sub>) puis après 10 mn, on évapore à sec et on reprend le résidu dans 100 ml environ de chloroforme. Cette solution chloroformique est lavée avec une solution aqueuse de sulfite de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) à 10%, puis avec de l'eau. On sèche ensuite sur du chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) puis on filtre et on évan-

30

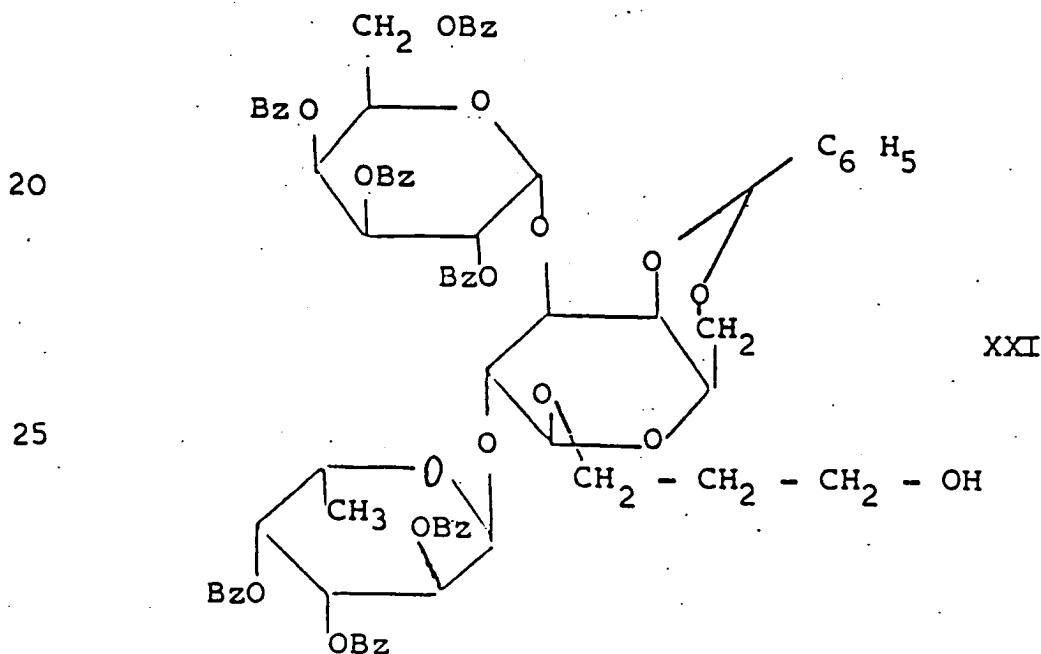
d'un mélange dioxane-eau (3:1 v/v) et soumis à agitation avec 52 mg de  $\text{NaIO}_4$  (1 éq.).

5 Au bout de 3 h, on ajoute 50 mg de  $\text{NaBH}_4$ , puis 10 mn après, on évapore à sec, et l'on reprend le résidu dans 100 ml de chloroforme. On procède au lavage de la solution chloroformique comme indiqué ci-dessus.

Le sirop obtenu est soumis à une chromatographie sur 20 g de silice ( $\text{SiO}_2$ ). On utilise comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane (3:1 v/v).

10 Le produit recueilli après évaporation dans l'éluant est cristallisé dans un mélange éther-hexane. On obtient 247 mg du trisaccharide recherché ; P.F. 83-84°C - rendement 79%.

15 EXEMPLE 6. Préparation du  $\alpha$ -hydroxypropyl-2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside, formule XXI :



30

On agite à température ambiante 312 mg du trisaccharide X (0,25mmole) dans du tétrahydrofurane anhydre (3ml) et on ajoute 0,8 ml d'une solution 0,5 M de 9-borabicyclo[3.3.1] nonane ou 9-BBN dans le tétrahydrofurane. Après 4 h de chauffage à reflux et refroidissement à la température ambiante, l'excès de 9-BBN

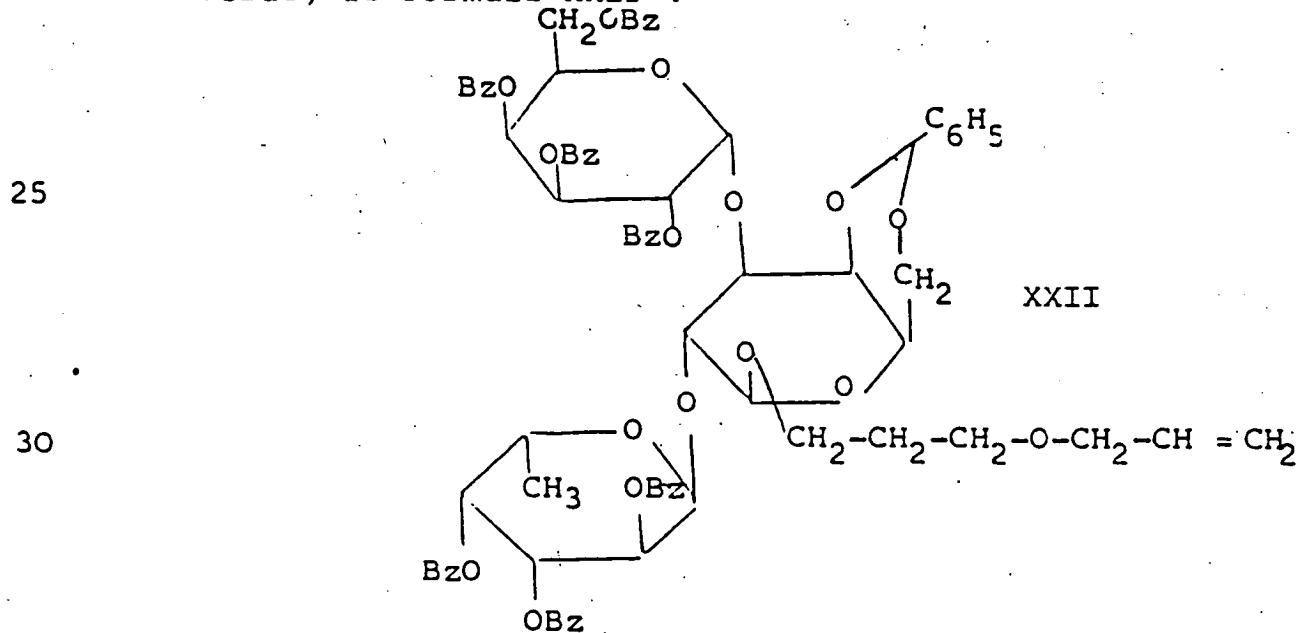
35

ensuite une solution aqueuse 3 M d'hydroxyde de sodium (0,2 ml), puis, goutte à goutte, 0,2 ml d'une solution 10 m d'eau oxygénée, en maintenant la température entre 40 et 50°C. Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à 50°C sous agitation pendant 1h. Après refroidissement, du carbonate de potassium solide (1g) et du dichlorométhane (20 ml) sont ajoutés. Les solides sont essorés et le filtrat est évaporé. Le résidu est purifié par passage sur une colonne de gel de silice (15 g) et élution à l'aide du mélange acétate d'éthyle-hexane (2:1, v/v). Le composé XXI est ainsi obtenu à l'état pur (292 mg, 92%),  $[\alpha]_D^{20} + 2^\circ$  ( $c$  1, chloroforme).

Ce composé est caractérisé par un acétate cristallin, P.F. 112-113°C,  $[\alpha]_D^{20} + 1,5^\circ$  ( $c$  1, chloroforme), spectre R.M.N. (chloroforme-d) :  $\delta$  1,20 (3H, d, 6,5 Hz, H-e-C), 2,00 (s, 3H, Ac), 7,10-7,60 (4OH, m, Ph).

#### EXEMPLE 7

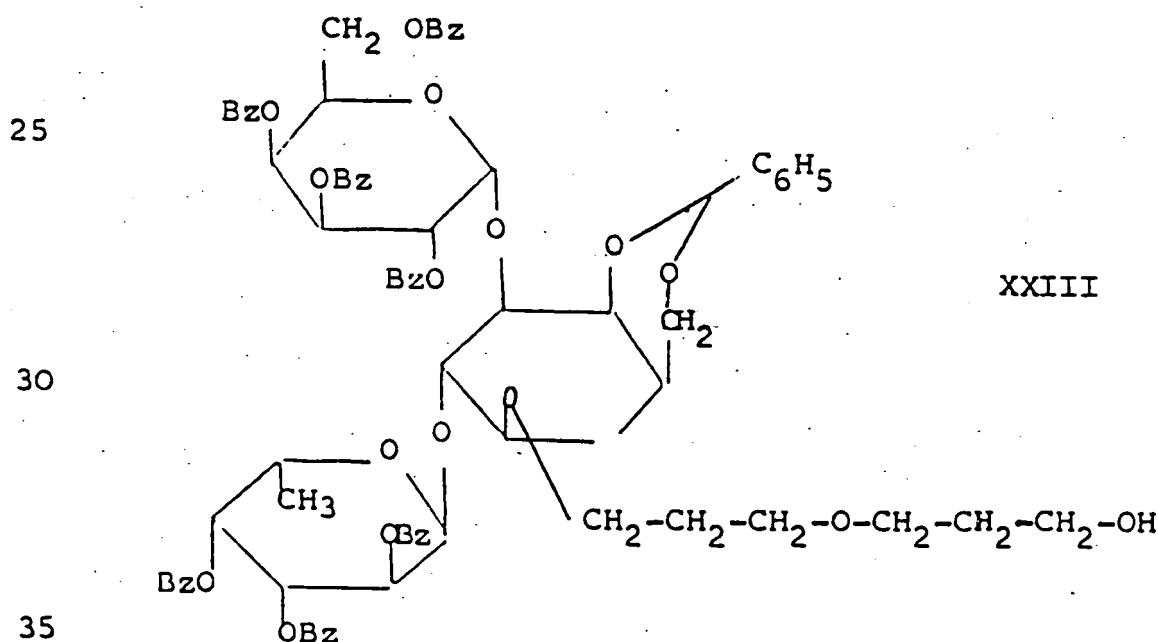
Préparation du  $\gamma$ -allyloxypropyl-2-O-(2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside, de formule XXII :



On agite à température ambiante 633 mg du composé XXI dans du N,N-diméthylformamide (10 ml) en présence d'hydrure de sodium (96 mg de dispersion à 50% dans de l'huile). Au bout d'une heure, du bromure d'allyle (0,15 ml) est ajouté. La réaction est complète en 1h30. Après addition de méthanol (2 ml), le milieu réactionnel est évaporé et le résidu repris dans du chloroforme (50 ml). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée. L'huile contenue dans le résidu est extraite avec de l'hexane bouillant (20 ml), le composé cherché est cristallisé dans un mélange acétate d'éthyle-hexane (588 mg, 90%), P.F. 103-104°C,  $[\alpha]_D^{20} + 3^\circ$  ( $\underline{\text{C}}$  1, chloroformé), spectre R.M.N. (chloroformé-d) :  $\delta$  1,21 (3H, d, J7Hz, Me-C), 7,10-7,55 (4OH, m, Ph).

#### EXEMPLE 8

Préparation du  $\tau$ [( $\tau$ -hydroxy) propyloxy]propyl-2-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-(2,3,4,6-tétra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-4,6-O-benzylidène- $\beta$ -D-galactopyranoside, de formule XXIII :

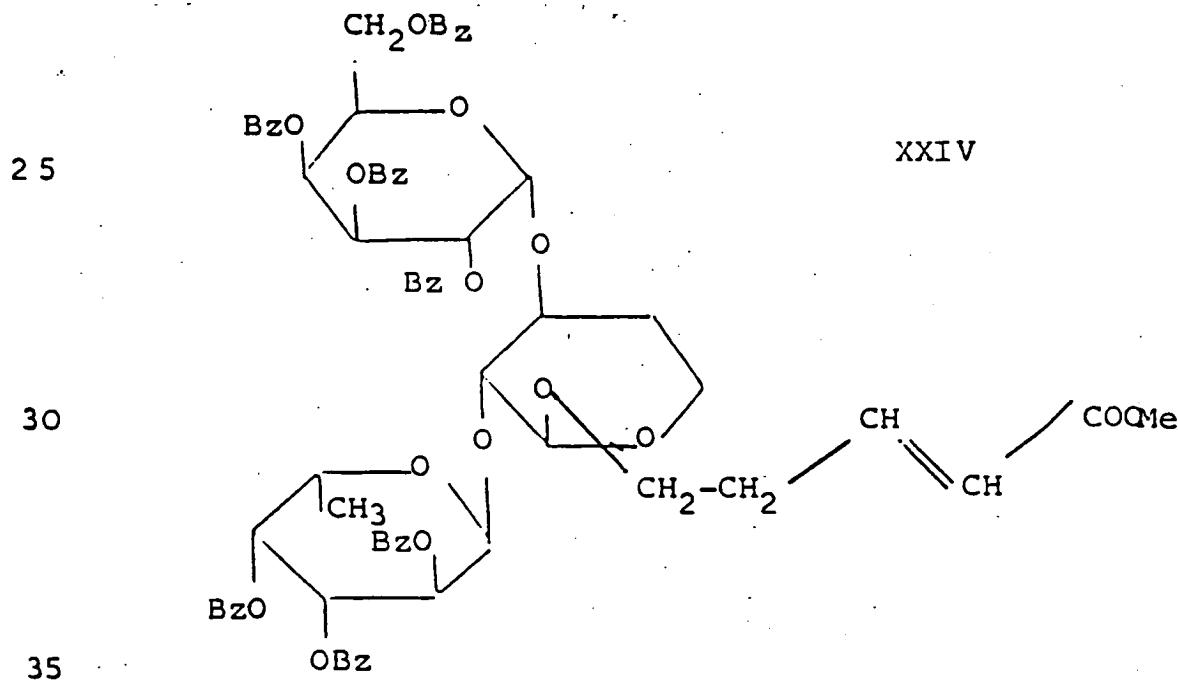


On agite à température ambiante 490 mg du dérivé XXII dans du tétrahydrofurane anhydre (4 ml) et on ajoute 1ml d'une solution 0,5 M de 9-BBN dans le tétrahydrofurane. Après 2 h30 de chauffage à reflux et refroidissement à la température ambiante, l'excès de 9-BBN est détruit par addition d'éthanol (1 ml). On ajoute ensuite une solution aqueuse 3 M d'hydroxyde de sodium (0,25ml) puis, goutte à goutte, 0,38 ml d'une solution 10 M d'eau oxygénée, en maintenant la température entre 40 et 50°C.

Le mélange réactionnel est ensuite chauffé à 50°C pendant 1 h. Après refroidissement, la phase aqueuse est saturée avec du carbonate de potassium (1g), filtrée et évaporée. Le résidu est purifié par passage sur une colonne de gel de silice (30 mg) et élution à l'aide du mélange acétate d'éthyle-hexane (2:1,v/v). Le composé XXIII est ainsi obtenu à l'état pur (442 mg, 89%),  $[\alpha]_D^{20} + 1,5^\circ$  (c 1, chloroforme), spectre R.M.N. (chloroforme-d) :  $\delta$  1,20 (3H, d, 6,5Hz, Me-C), 7,60-7,70 (4OH, m, Ph).

EXEMPLE 9

Préparation du composé de formule XXIV :



A un mélange de dichlorométhane (15ml) et de pyridine (0,644 ml) on ajoute, sous agitation et à l'abri de l'humidité, du trioxyde de chrome sec (400 mg). Après 20 minutes d'agitation, une solution du trisaccharide 5 XXI (633mg) dans le dichlorométhane (5 ml) est ajoutée. Au bout de 20 minutes, le milieu réactionnel est décanié, le résidu étant extrait au chloroforme. La phase chloroformique est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (10 g) à l'aide du mélange acétate d'éthyle-hexane (3:1, v/v). L'aldéhyde obtenu (575 mg, 91%) est transformé en dérivé XXIV grâce à une réaction de Wittig classique dans le benzène (15 ml). 10 15 dérivé est cristallisé dans éther-hexane (524 mg, 88% p.f. 152-153°,  $[\alpha]_D^{20} -3^\circ$  (c 1, chloroforme), spectre R.M.N. (chloroformé-d) :  $\delta$  1,23 (3H, d, 6,5 Hz, Me-C), 3,69 (3H, s, COOMe), 7,10-7,55 (4OH, m, Ph).

EXEMPLE 10 -

20 Application de trisaccharides de l'invention en tant qu'immunoabsorbants :

a) - On procède à la fixation du trisaccharide XXIV sur des supports à base d'agarose.

1°) - On utilise une matrice d'agarose activée recouverte par de la sérum albumine humaine.

25 L'activation de l'agarose est réalisée avec du bromure de cyanogène CNBr selon la méthode de Axen et al décrite dans Nature, 214, 1302 (1967) modifiée par March et al suivant la technique décrite dans Anal. Biochem., 60 149 (1964).

Pour recouvrir l'agarose par de la sérum albumine humaine, on opère suivant la méthode de Parikh et al décrite dans "Methods in enzymology", 35, 77 (1974) - 1 ml. de gel d'agarose tassé contient environ 2 mg d'albumine.

30 35 On effectue le couplage du trisaccharide XXIV sur le dérivé d'agarose-albumine à l'aide de 1-cyclohexyl-3-(2-

en opérant selon les techniques connues dans ce domaine, en particulier celle de Parikh et al dont question ci-dessus, ou de Weetall et al dans le même ouvrage, p.59, ou encore de Hoare et al dans JACS 88, 2057, (1966) ou 5 J. Biol. Chem. 242, 2447 (1967).

On introduit ainsi environ 10 à 20 molécules de trisaccharide XXIV par molécule d'albumine.

2°) - Dans une variante, le support est constitué par de l'agarose activée comme indiqué ci-dessus, transformée 10 ensuite en un dérivé d'aminoalcoylagarose à l'aide d'éthylenediamine selon le mode opératoire décrit par Cohen dans Methods in Enzymology 35, 102 (1974). Le couplage du dérivé d'agarose obtenu avec le trisaccharide XXIV est effectué à l'aide du dérivé de carbodiimide comme exposé 15 plus haut. On procède ensuite à l'acétylation du produit de couplage pour éliminer l'excès des groupements amino.  
b - On constitue une autre série d'immunoabsorbants en fixant un dérivé de trisaccharide de formule II dans laquelle R représente un atome d'hydrogène et A est un 20 groupe  $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_4-NH_2$  sur de la carboxy-méthyl cellulose. Le couplage est effectué à l'aide du dérivé de carbodiimide comme décrit plus haut.

EXEMPLE 11 -

Utilisation du trisaccharide de formule XXIV pour la 25 neutralisation des hémolysines anti-B.

On utilise une solution à 10 mg/ml du produit de formule XXIV. En opérant selon les techniques de la pharmacopée européenne, on constate une inhibition totale d'une dose agglutinante d'un sérum-test anti-B avec une dilution 30 1/5 du trisaccharide de l'invention.

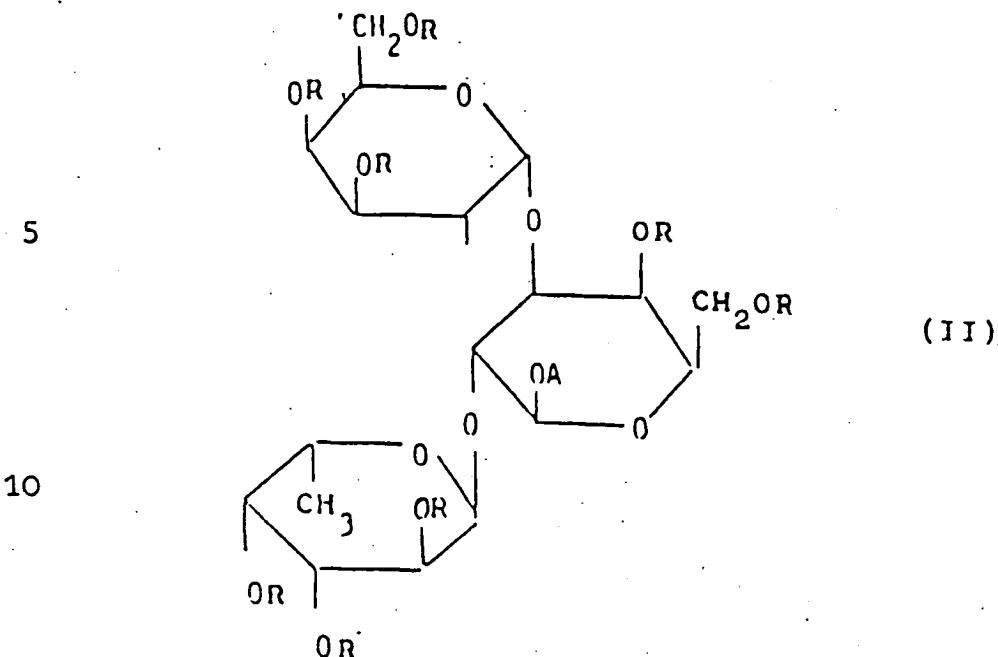
## Revendications de brevet

1. Procédé de préparation de dérivés d'osides, caractérisé par le fait qu'on fait réagir
  - un dérivé d'oside a) constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché (s) à un reste organique, ce motif ose, ou l'un au moins de ces motifs oses, étant substitué, sur le carbone anomère en position 1 par un groupe -O- imidyle de formule  $-O-C(-R_2)=N-R_1$  dans lequel les substituants  $R_1$  et  $R_2$ , identiques ou différents l'un de l'autre, représentent un radical aryle ou un radical alcoyle comprenant de préférence 1 à 4 atomes de carbone, les groupes -CH du dérivé d'oside étant protégés par des groupes appropriés, avec
    - un dérivé d'oside b) constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché (s) à un reste organique, un seul groupe -OH de ce ou ces motifs oses étant libre et occupant l'une quelconque des positions hydroxyle secondaire 1 à 4, les dérivés d'osides a) et/ou b) comprenant un motif avec au moins deux oses.
2. Procédé de préparation de dérivés d'osides, caractérisé par le fait que pour obtenir des osides branchés on fait réagir le dérivé d'oside a) selon la revendication 1 avec un dérivé d'oside constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché (s) à un reste organique, un seul groupe -OH de ce ou ces motifs étant libre et occupant une position hydroxyle 1 à 4 ou 6 permettant la formation d'une chaîne osidique branchée.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait que le dérivé d'oside a) mis en œuvre est constitué par un motif galactopyranose.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé par le fait que le dérivé d'oside a) est constitué par un motif fucopyranose.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que le dérivé d'oside b) comprend un motif ose comportant en position 1 une subs-

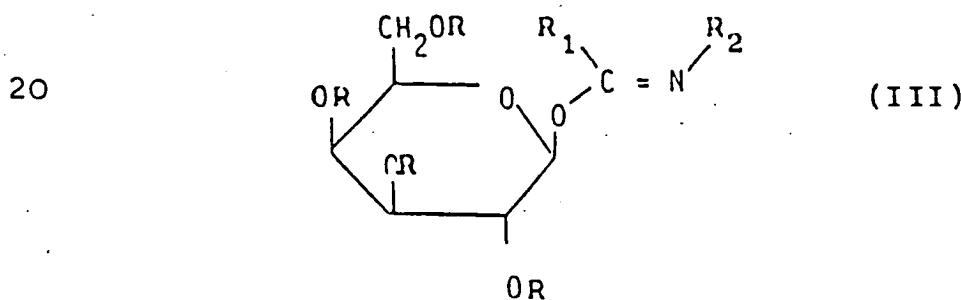
réactif dans les conditions de la synthèse osidique ou rendu non réactif, ou par un groupe fonctionnalisable, c'est-à-dire autorisant au cours ou en fin de synthèse l'introduction de groupements fonctionnels.

- 5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que, dans la substitution -OA, A représente un radical comportant une ou plusieurs liaisons insaturées, tel qu'un radical éthyléniquement insaturé, de préférence le radical alcényle comprenant de 2 à 10 atomes de carbone, ainsi que tout radical auquel peut donner lieu, selon les techniques classiques de synthèse organique, la fonctionnalisation de la ou des liaisons insaturées en question.
- 10 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que A représente un radical alcoyle, comportant notamment 2 à 10 atomes de carbone, et substitué par au moins un groupe -OH qui, le cas échéant, est protégé par un groupe de blocage ou engagé dans un radical fonctionnel.
- 15 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que A représente le radical allyle.
9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que A représente un groupe fonctionnel renfermant au moins un radical éther et/ou amine.
- 20 25 10. Procédé de préparation d'un dérivé de trisaccharide branché comprenant un énchaînement galactopyranose - galactopyranose - fucopyranose et répondant à la structure II :

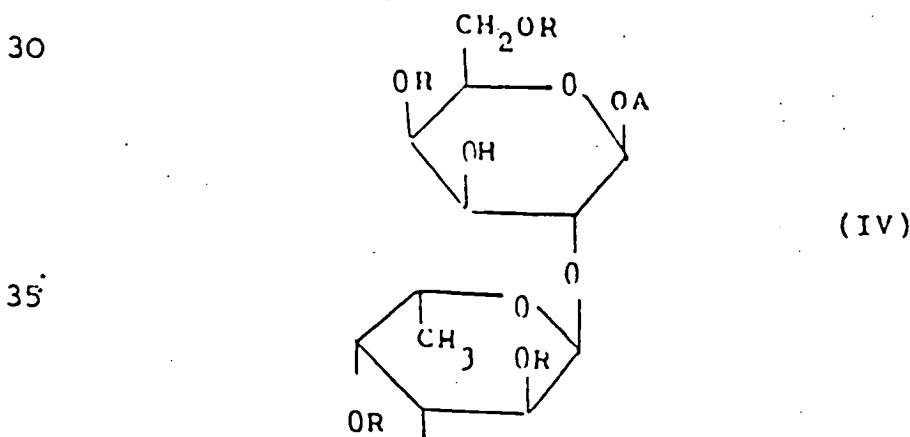
38



caractérisé par le fait qu'on fait réagir  
- un 1-O-imidyl- $\beta$ -D-galactopyranose de formule III :



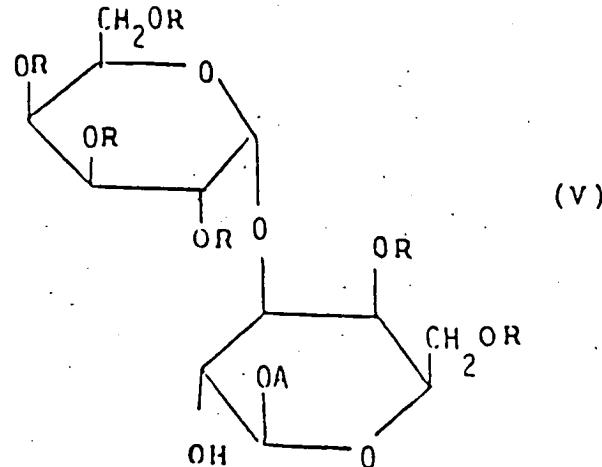
avec un disaccharide constitué par un fuco-galactopyra-  
nose comportant un groupement -OH libre en position 3  
du motif galactopyranose, ce disaccharide répondant à  
la formule IV :



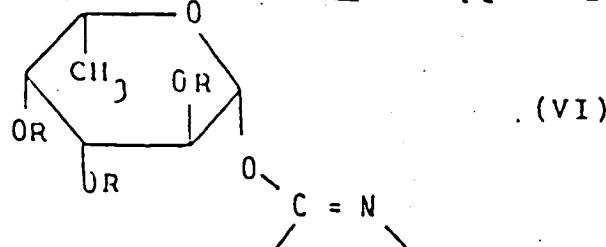
dans lesquelles :

- les substituants R, identiques ou différents les uns des autres, représentent des groupes de protection de radicaux hydroxyle, le cas échéant avec un substituant voisin, et sont choisis parmi des groupes stables, non réactifs dans les conditions habituelles de synthèse osidiques et facilement éliminables, dans des conditions douces compatibles avec le maintien de la structure osidique, en particulier par des groupes constituant avec l'atome d'oxygène de l'hydroxyle des éthers benzyliques ou des acétals benzylidéniques,
- A représente un reste organique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 9, et
- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> présentent les significations données dans la revendication 3.

11. Procédé de préparation du dérivé de trisaccharide de formule II, selon la revendication 10, caractérisé par le fait qu'on met en oeuvre un digalactopyranose, comportant un groupement -OH libre en position 2 de l'un des motifs galactopyranose, et répondant à la formule V :



et qu'on effectue sa condensation avec le groupe -O-imidyle d'un 1-O-imidyl- $\beta$ -L-fucopyranose de formule VI :



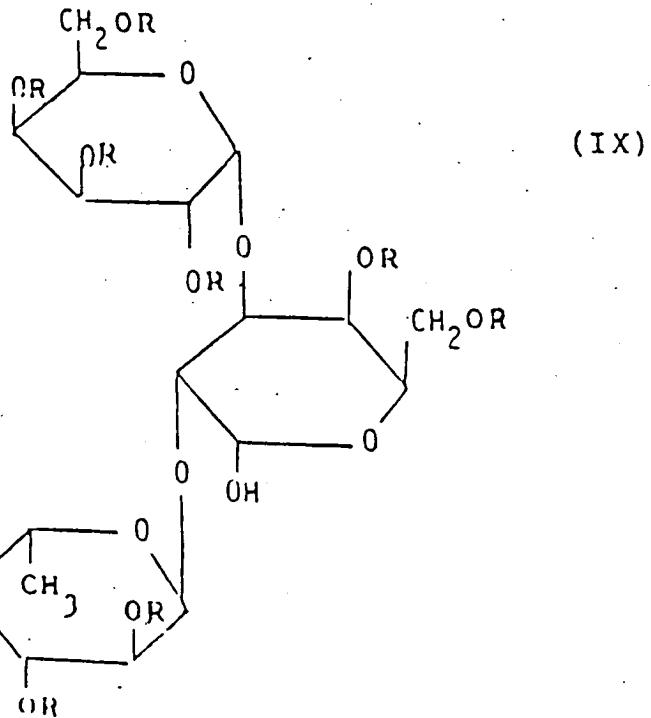
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R et A présentant dans ces formules les significations données dans la revendication 10.

12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé par le fait que le substituant A du disaccharide de formule IV est constitué par . le radical allyle.

5 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'on opère en présence d'acide p-toluène sulfonique anhydre et de nitrométhane.

10 14. Les disaccharides de formules IV et V nécessaires dans le procédé respectivement selon la revendication 10 ou 11.

15 15. Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13 à la synthèse du trisaccharide B, caractérisé par le fait qu'on procède à l'élimination séquentielle, dans des conditions douces selon les techniques classiques, du substituant A du produit de structure II obtenu, ce qui conduit à un produit de structure IX :



suivie d'une hydrogénolyse.

16. Nouveaux osides tels qu'obtenus par réaction

- d'un dérivé d'oside a) constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché(s) à un reste organique, ce motif ose, ou l'un au moins de ces motifs oses, étant substitué, sur le carbone anomère en position 1 par un groupe -O- imidyle de formule  $-O-C(-R_2)=N-R_1$  dans lequel les substituants  $R_1$  et  $R_2$ , identiques ou différents l'un de l'autre, représentent un radical aryle ou un radical alcoyle comprenant de préférence 1 à 4 atomes de carbone, les groupes -OH du dérivé d'oside étant protégés par des groupes appropriés, avec  
- un dérivé d'oside b) constitué par un ou plusieurs motifs oses, éventuellement rattaché(s) à un reste organique, un seul groupe-OH de ce ou ces motifs oses étant libre et occupant l'une quelconque des positions hydroxyle secondaire 1 à 4, les dérivés d'osides a) et/ou b) comprenant un motif avec au moins deux oses.

17. Nouveaux osides selon la revendication 16 comportant

au moins un motif galactopyranose dans lequel l'atome d'hydrogène du groupe -OH en position 1 est substitué par un radical A représentant un groupe alcoyle substitué par au moins un groupe hydroxyle, le cas échéant protégé par un groupe de blocage ou engagé dans un radical fonctionnel, ou encore un groupe comportant une ou plusieurs liaisons insaturées, en particulier un radical éthyléniquement insaturé choisi parmi les radicaux alcényle, et plus spécialement les radicaux alcényle à 2 à 10 atomes de carbone, ou un radical alcoxy-alcényle, alcoxy-alcool, alcoxy-ester,-amide ou -amine, alcoxy-alcoylamine ou alcoyl-amide ou alcoxy-acide carboxylique, ces différents groupes chimiques pouvant comporter en outre une fonction amine intercalaire.

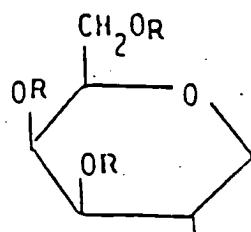
18. Nouveaux osides selon la revendication 17, caractérisés par le fait que le radical A est tel que défini dans l'une des revendications 7 à 9.

19. Nouveaux osides

sés par le fait que ledit motif galactopyranose est impliqué dans une chaîne trisaccharide linéaire ou branchée comprenant un motif fucopyranose et un autre motif galactopyranose.

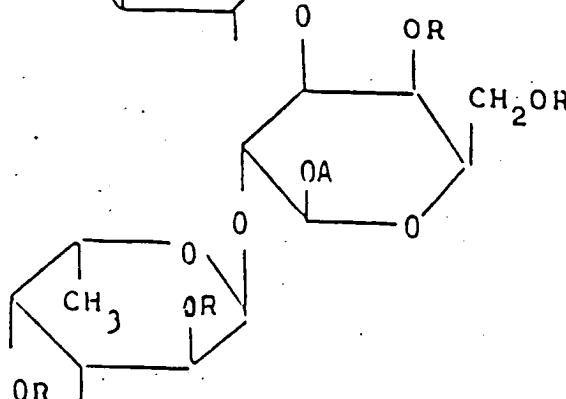
5 20. Nouveaux osides selon la revendication 19, caractérisés par le fait qu'il s'agit de trisaccharides branchés de formule II

10



(II)

15



20

dans laquelle :

- les substituants R, identiques ou différents les uns des autres, représentent, le cas échéant avec un substituant voisin, des groupes de protection de radicaux hydroxyle et sont choisis parmi des groupes stables, non réactifs dans les conditions habituelles de synthèse osidique et facilement éliminables, dans des conditions douces compatibles avec le maintien de la structure osidique, en particulier par des groupes benzyle ou benzylidényle, ou représentent un atome d'hydrogène,
- A représente un reste organique comportant au moins un groupe fonctionnalisable constitué en particulier par un radical éthyléniquement insaturé choisi parmi les radicaux alcényle, de préférence de 2 à 10 atomes de carbone, et plus particulièrement constitué par le radical

allyle, où encore par un radical hydroxyalcoyle, plus spécialement  $\beta$  hydroxyalcoyle ou  $\alpha$  hydroxypropyle dans lequel le groupe -OH est éventuellement protégé.

21.- Les trisaccharides selon la revendication 20, 5 dans lesquels les différents substituants R représentent un atome d'hydrogène.

22.- Les trisaccharides de formule II selon la revendication 20 dans laquelle A représente un groupement allyle.

10 23.- Application des trisaccharides selon la revendication 22 à la synthèse du trisaccharide B selon le procédé de la revendication 15.

15 24.- Applications biologiques des osides, selon l'une quelconque des revendications 16 à 22, notamment comme immunoabsorbants ou pour la constitution d'un antigène B artificiel.

20 25.- Applications des osides selon l'une quelconque des revendications 16 à 22 sous forme libre ou immobilisés sur support à la constitution de réactifs biologiques, en particulier pour la détection et la neutralisation des hémolysines.

25 26.- Applications des osides selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, sous forme libre ou immobilisés sur support, à la préparation de sérum-tests présentant une spécificité donnée.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 79/00031

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>3</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

C 07 H 3/08, C 07 H 3/06, C 07 H 15/18, A 61 K 31/70, G 01 N 33/16

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée <sup>4</sup>

Système de classification	Symboles de classification
Int.Cl. <sup>2</sup>	C 07 H 3/00, C 07 H 15/18
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>5</sup>	

## III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS <sup>14</sup>

Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>15</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>17</sup>	N° des revendications visées <sup>16</sup>
X	Tetrahedron Letters, no. 45, November 1976, J.-R. Pougny et P. Sinay, "Réaction d'imides de glucopyranosyle avec l'acétonitrile. Appli- cations synthétiques", pages 4073-4076, voir page 4073, schema 1, dérivé 2; page 4075, dernier alinéa  --	1-13
A	L.F. Fieser et M. Fieser, 'Reagents for organic synthesis', publié 1967, John Wiley & Sons (New York, etc.), voir page 286 "Dimethyl- chloroformiminium chloride"; page 288 "De- hydrative coupling"  --	1-13
A	Journal of the Chemical Society; Perkin Transactions I; Organic and Bio-organic Chemistry, 22, 1977, P. Rollin et P. Sinay, "Preparation of benzyl ethers of 1,2-dideoxy-2'-methyl- $\alpha$ -D-gluco- pyranosid[2,1-d]- $\Delta$ <sup>2</sup> -oxazoline for use in oligo- saccharide synthesis", page 2513, voir page 2514, colonne de droite, alinéa 2  .//.	1-13

\* Catégories spéciales de documents cités: <sup>15</sup>

« A » document définissant l'état général de la technique

« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt interna-  
tional ou après cette date

« L » document cité pour raison spéciale autre que celles qui sont  
mentionnées dans les autres catégories

« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à  
une exposition ou tous autres moyens

« P » document publié avant la date de dépôt international mais  
à la date de priorité revendiquée ou après celle-ci

« T » document ultérieur publié à la date de dépôt international ou  
à la date de priorité, ou après, et n'appartenant pas à l'état  
de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le  
principe ou la théorie constituant la base de l'invention

« X » document particulièrement pertinent

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement  
achevée <sup>18</sup>

21 septembre 1979

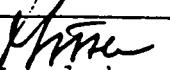
Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <sup>19</sup>

24 septembre 1979

Administration chargée de la recherche internationale <sup>1</sup>

Office Européen des Brevets

Signature du fonctionnaire autorisé <sup>20</sup>

  
G. T. M. Kruydenberg

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE

-2-

X	Journal of the Chemical Society; Perkin Transactions I; Organic and Bio-organic Chemistry, 11, 1977, C. Augé et A. Veyrières, "Studies in oligosaccharide chemistry, Part 8. Synthesis of lacto-N-triose I, a core chain trisaccharide of human blood-group substances", page 1343, voir page 1343, résumé	1-13, 17, 18, 24-26
A	Journal of the Chemical Society; Perkin Transactions I; Organic and Bio-organic chemistry, 4, 1975, P.A. Gent et R. Gigg, "The allyl ether as a protecting group in carbohydrate	1-13 .//.

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE<sup>10</sup>

Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications numéros ..... se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, <sup>12</sup> à savoir:
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2.  Les revendications numéros ..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, <sup>13</sup> précisément:

VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION<sup>11</sup>

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire: revendications 1-13, 15 et 23: Procédé de préparation de dérivés d'osides contenant au moins trois motifs oses, et la transformation des produits obtenus en trisaccharide B).

revendication 14: Disaccharides comme intermédiaires. .//.

1.  Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
  2.  Comme seulement une partie taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
- 1-13, 15 et 23; 16-22 et 24-26
3.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numéros:

## Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
- Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE**

-3-

chemistry. Part VII. The 2-O-allyl group as a non-participant in 1,2-cis-glucoside synthesis" page 361, voir page 361, résumé

1

- A Journal of the American Chemical Society, 97:14, juillet 1975, R.U. Lemieux et H. Driguez, "The chemical synthesis of 2-O-( $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-3-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-D-galactose. The terminal structure of the blood-group B antigenic determinant", pages 4069-75, voir page 4069, résumé.

10

• / •

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE<sup>16</sup>

**Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:**

1.  Les revendications numéros ..... se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, <sup>12</sup> à savoir:

2.  Les revendications numéros ..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, <sup>13</sup> précisément:

#### **VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION**

**L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:**

suite du formulaire PCT/ISA/210 (feuille supplémentaire 2), page 2:

revendications 16-22 et 24-26: Nouveaux dérivés d'osides contenant au moins trois motifs oses et l'application de ces osides.

- Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
  - Comme seulement une des partie taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
  - Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numérotées:

#### **Remarque quant à la réserve**

- Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.  
 Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIÈME FEUILLE**

-4-

- X The Journal of Organic Chemistry, Vol. 42, no.4, 17-19  
18 février 1977, J.-C. Jacquinot et P. Sinay,  
"Synthesis of blood-group substances. 6. Syn-  
thesis of O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-  
galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[ $\alpha$ -L-fucopyranosyl-  
(1 $\rightarrow$ 3)]-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-gluco-  
pyranose, the postulated Lewis d antigenic  
determinant", pages 720-724, voir page 720,  
résumé et colonne de gauche

--

X Chemical Abstracts, Vol. 87, no. 3, 18 juillet 1-13,17-19  
1977 (Columbus, Ohio, U.S.A.), C. Augé et

**V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE<sup>10</sup>**

**Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:**

1.  Les revendications numéros ..... se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, 1<sup>e</sup> à savoir:

2.  Les revendications numéros ..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée. 1<sup>e</sup> précisément:

#### **VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:

- Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
  - Comme seulement une des parties taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
  - Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numéros:

#### **Remarque quant à la réserve**

- Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
  - Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE

-5-

A. Veyrières, "Studies in oligosaccharide chemistry; Part VII. Syntheses of 3-O-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranose ("lacto-N-biose II") and 3,4-di-O-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-galactopyranose", voir page 690, colonne 2, réf. 23639a, Carbohydr. Res. 1977, 54(1), 45-59

---

- X Journal of the Chemical Society; Perkin Transactions; Organic and Bio-organic Chemistry, 18, 1975, P.A. Gent et R. Gigg, "Synthesis ... 17,18

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE<sup>10</sup>

Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications numéros ..... se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, <sup>11</sup> à savoir:
2.  Les revendications numéros ..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, <sup>12</sup> précisément:

VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION<sup>13</sup>

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:

1.  Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme seulement une partie taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
3.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numéros:

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
- Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE**

-6-

of 3-O-[6-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl]- $\beta$ -D-galactopyranosyl}-1,2-di-0-stearoyl-L-glycerol, a 'Trigalactosyl di-glyceride' ", pages 1779-1781

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE<sup>10</sup>

**Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:**

1.  Les revendications numéros ..... se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, <sup>12</sup> à savoir:
  
  2.  Les revendications numéros ..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée. <sup>13</sup> précisément:

#### **VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION**

**L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:**

- Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
  - Comme seulement une des parties taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
  - Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numérotées:

### **Remarque quant à la réserve**

- Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
  - Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR79/00031

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

C07H 3/08, C07H 3./06, C07H 15/18, A61K 31/70, G01N 33/16

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched \*

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.2	C 07 H 3/00, C 07 H 15/18

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>14</sup>

Category *	Citation of Document, <sup>15</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>16</sup>	Relevant to Claim No. <sup>18</sup>
X	Tetrahedron Letters, no. 45, November 1976, J.R. Pougny and P.Sinay "Réaction d'imides de glucopyranosyle avec l'acetonitrile. Applications synthétiques", pages 4073-4076, see page 4073, figure 1, derivative 2; page 4075, last paragraph	1-13
A	L.F. Fieser and M. Fieser, 'Reagents for organic synthesis', published on 1967, John Wiley & Sons (New York, etc), see page 286 "Dimethyl-chloroformiminium chloride"; page 288 "Dehydrative coupling",	1-13
A	Journal of the Chemical Society; Perkin Transactions I; Organic and Bio-organic Chemistry, 22 1977, P.Rollin and P. Sinay, "Preparation of benzyl ethers of 1,2-dideoxy-2- methyl-D-glucopyranose 2,1-d-oxazoline for use in oligosaccharide synthesis" page 2513, see page 2514, right-hand column, paragraph 2	1-13
X	Journal of the Chemical Society ; Perkin Transactions I; Organic and Bio-organic Chemistry, 11, 1977, C.Augé and A.Veyrières, "Studies in oligosaccharide chemistry, Part 8. Synthesis of lacto-N-triose I, a core chain trisaccharide of human blood-group substances", page 1343, see page 1343, abstract	1-13,17,18, 24-26
		/..

\* Special categories of cited documents: <sup>15</sup>

- "A" document defining the general state of the art
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document cited for special reason other than those referred to in the other categories
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but on or after the priority date claimed

"T" later document published on or after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search <sup>19</sup>	Date of Mailing of this International Search Report <sup>20</sup>
21 September 1979 (21.09.79)	24 September 1979 (24.09.79)
International Searching Authority <sup>21</sup>	Signature of Authorized Officer <sup>20</sup>
European Patent Office	

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

-2-

A	Journal of the Chemical Society ; Perkin Transactions I; Organic and Bio-organic chemistry, 4, 1975, P.A. Gent and R. Gigg, "The allyl ether as a protecting group in carbohydrate chemistry. Part VII. The 2-o-allyl group as a non-participant in 1,2-cis-glucoside synthesis" page 361, see page 361, abstract	1-13
A	Journal of the American Chemical Society, 97:14, July 1975, R.U. Lemieux and H. Driguez, "The chemical synthesis of 2-O-(L-fucopyranosyl)-3-O-(D-galactopyranosyl)-D-galactose. The terminal structure of the blood-group B antigenic determinant", pages 4069-75, see page 4069, abstract	23

/..

V.  OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>10</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1.  Claim numbers \_\_\_\_\_, because they relate to subject matter<sup>11</sup> not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claim numbers \_\_\_\_\_, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out<sup>12</sup>, specifically:

VI.  OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>13</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

claims 1-13, 15 and 23: Process for the preparation of oside compounds containing at least three ose patterns, and transformation of the products obstrined into trisaccharide B.

Claim 14: Disaccharides as intermediates.

Claims 16-22 and 24-26: New oside compounds conteining at least three ose patterns and application of said osides.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

1-13, 15 and 23; 16-22 and 24-26

3.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

-3-

X	The Journal of Organic Chemistry, Vol. 42, no.4, 18 February 1977, J.-C. Jacquinot and P. Sinay, "Synthesis of blood-group substances. 6. Synthesis of O- -L-fucopyranosyl-(1 2)-O- -D-galactopyranosyl-(1 4)-O -L-fucopyranosyl- (1 3) -2-acetamido-2-deoxy- -D-glucopyranose, the postulated Lewis d antigenic determinant", pages 720-724, see page 720, abstract and left-hand column	17-19
X	Chemical Abstracts, Vol. 87, no. 3, 18 July 1977 , (Columbus, Ohio, U.S.A.) C. Augé and A. Veyrières, "Studies in oligosaccharide chemistry; Part VII. Syntheses of 3-O-(2-acetamido-2-deoxy- -D-glucopyranosyl) - D-galactopyranose ("lacto-N-biose II") and 3,4-di-o-(2-acetamido-2-deoxy- -D-glucopyranosyl) - D-galactopyranose", see page 690, column 2, ref. 23639a, Carbohydr. Res. 1977, 54(1 ), 45-59	1-13, 17-19

V.  OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>10</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1.  Claim numbers ..... because they relate to subject matter<sup>12</sup> not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claim numbers ..... because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out<sup>13</sup>, specifically:

VI.  OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>11</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

- 4 -

Journal of the Chemical Society; Perkin Transactions; Organic and Bio-organic Chemistry, 18, 1975, P.A. Gent and R. Gigg, "Synthesis" of 3-O-[6-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl] $\beta$ -D-galactopyranosyl]-1,2-di-O-stearoyl-L-glycerol, a 'trigalactosyl di-glyceride', pages 1779-1781

17,18

V.  OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE<sup>10</sup>

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1.  Claim numbers ..... because they relate to subject matter<sup>11</sup> not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claim numbers ..... because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out<sup>12</sup>, specifically:

VI.  OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING<sup>13</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims of the International application.

2.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:

3.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.